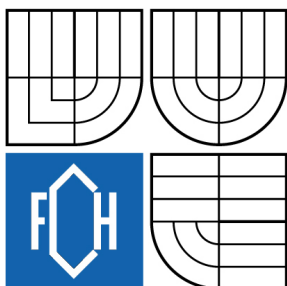


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM VYBRANÝCH MODIFIKOVANÝCH KOLAGENOVÝCH BIOMATERIÁLŮ

STUDY OF SOME MODIFIED COLAGEN BIOMATERIALS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

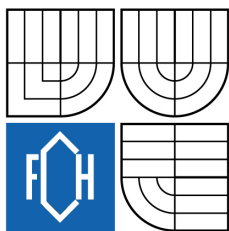
Bc. LUCIE ZOUHAROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0271/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lucie Zouharová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Studium vybraných modifikovaných kolagenových biomateriálů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše - biomateriály, biokompatibilita, kolagen.
2. Optimalizace postupu izolace kolagenu z různých druhů živočišných tkání.
3. Testování metod ke sledování stability kolagenových preparátů a modifikovaných biomateriálů s kolagenem.
4. Studium stability kolagenu a biomateriálů s kolagenem v modelovém fyziologickém prostředí.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lucie Zouharová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem předložené práce je studium a biochemická charakterizace modifikovaných materiálů na bázi kolagenu (připravené na ÚCHM FCH VUT v Brně), optimalizace postupu izolace kolagenu z různých druhů živočišných tkání a testování stability kolagenových preparátů.

V rámci experimentální části práce byla provedena izolace kolagenu z pěti různých druhů živočišných tkání s uspokojivým výtěžkem. Koncentrace celkových proteinů byla analyzována metodou Biuretovou a Hartree – Lowryho, k měření koncentrace volných aminoskupin bylo využito metody TNBSA. Charakterizace proteinového složení kolagenu byla provedena elektroforézou PAGE-SDS. Jako srovnávací analýza byl využit mikrofluidní elektroforetický systém na mikročipech. V rámci práce byla testována i možnost separace a purifikace kolagenů pomocí gelové chromatografie. K bližší charakterizaci kolagenových preparátů byl proveden test tepelné stability s využitím ultrazvukové spektroskopie. Biologická stabilita byla testována v modelovém fyziologickém prostředí.

ABSTRACT

The aim of the presented work is the study and biochemical characterization of some modified collagen materials (prepared on Institute of Material Science, Faculty of Chemistry, BUT), optimization of collagen isolation from various types of animal tissues and testing of isolated collagen stability.

First, isolation of collagen from five different animal tissues was performed with satisfactory yields. The concentration of total proteins was measured by Biuret and Hartree – Lowry method, the concentration of free amino groups was measured by TNBSA method. Protein analysis in collagen preparatives was performed by vertical electrophoresis PAGE-SDS and by microfluidic electrophoretic system Experion for comparison. Further purification and separation of collagen isolates by gel permeation chromatography was tested too. To detailed characterization thermal stability of collagen specimens was performed by high performance ultrasonic spectroscopy. Biological stability of collagen was tested in model physiological conditions.

KLÍČOVÁ SLOVA

biomateriál, kolagen, kolagenáza

KEYWORDS

biomaterial, collagen, collagenase

ZOUHAROVÁ, L. *Studium vybraných modifikovaných kolagenových biomateriálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 108 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkanem FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Mé poděkování patří zejména vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za odborné vedení, pomoc a všestrannou podporu v průběhu práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. J. Kučeríkovi, Ph.D. za pomoc s analýzami pomocí ultrazvukové spektroskopie a kolektivu z laboratoře Biomateriálů (ÚCHM FCH VUT v Brně) za poskytnutí vzorků modifikovaných kolagenů a vstřícnost při vzájemné spolupráci.

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1	Kolagen	13
2.1.1	Makromolekulární charakter kolagenu	13
2.1.2	Degradace kolagenu	14
2.1.2.1	Hydrolytická degradace	15
2.1.2.2	Enzymatická degradace	15
2.1.2.3	Oxidační štěpení	15
2.1.3	Fyzikálně chemické vlastnosti kolagenu.....	16
2.1.3.1	Polyelektrolytický charakter	16
2.1.3.2	Botnání.....	16
2.1.3.3	Denaturace a renaturace.....	16
2.1.3.4	Hydrotermální stabilita	17
2.1.3.5	Hydratace kolagenu	17
2.1.3.6	Přeměna na želatinu	17
2.1.4	Roztok kolagenu.....	17
2.1.5	Biomedicínké aplikace kolagenu.....	18
2.2	Biokompatibilita a biomateriály	20
2.2.1	Úvod a definice	20
2.2.2	Materiály pro lékařské pomůcky (komponenty) a jejich složky	22
2.2.3	<i>In vitro</i> testování biokompatibility	23
2.2.4	<i>In vivo</i> testování biokompatibility.....	23
2.2.4.1	Přecitlivělost, podrážděnost a intradermální reaktivita.....	24
2.2.4.2	Systémová (akutní) toxicita, subakutní a subchronická toxicita.....	24
2.2.4.3	Genotoxicita.....	25
2.2.4.4	Implantace.....	25
2.2.4.5	Hemokompatibilita	25
2.2.4.6	Chronická toxicita.....	26
2.2.4.7	Karcinogenita.....	26
2.2.4.8	Reprodukční a vývojová toxicita	26
2.2.4.9	Biodegradace	26
2.2.4.10	Imunitní odezva	27
2.3	Proteiny jako biomateriály	27
2.3.1	Struktura a syntéza proteinů	27
2.3.2	Kolagen jako biomateriál	29
2.3.2.1	Mechanické vlastnosti	29
2.3.2.2	Fyziologická odezva	29
2.3.3	Další používané proteiny a polymery aminokyselin	30
2.4	Další používané biomateriály	31
2.5	Izolace kolagenu z živočišných tkání.....	31
2.6	Metody analýzy proteinů.....	33
2.6.1	Stanovení koncentrace proteinů	33
2.6.1.1	Biuretová metoda.....	34
2.6.1.2	Hartree – Lowryho metoda.....	34
2.6.2	Metoda TNBSA.....	34
2.6.3	Elektromigrační (elektroforetické) metody	35

2.6.3.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE), popř. s přidavkem SDS (PAGE-SDS).....	36
2.6.3.2	Mikrofluidní elektroforetické techniky.....	39
2.6.4	Gelová chromatografie (gelová permeační chromatografie, gelová filtrace) ..	39
2.6.5	Další metody používané k charakterizaci kolagenu	40
	CÍLE PRÁCE.....	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	43
3.1	Použité chemikálie, biologický materiál, přístroje a zařízení	43
3.1.1	Chemikálie	43
3.1.1.1	Standardní chemikálie	43
3.1.1.2	Chemikálie – elektroforéza PAGE-SDS.....	43
3.1.1.3	Chemikálie – izolace kolagenu	43
3.1.1.4	Ostatní chemikálie	43
3.1.2	Biologický materiál	44
3.1.3	Přístroje a zařízení.....	44
3.2	Postup izolace kolagenu z živočišné tkáně	45
3.3	Stanovení celkové koncentrace proteinů.....	45
3.3.1	Biuretová metoda	46
3.3.1.1	Roztoky.....	46
3.3.1.2	Měření koncentrace bílkovin v biologických vzorcích	46
3.3.1.3	Měření koncentrace peptidových vazeb během sledování stability kolagenu	46
3.3.2	Hartee – Lowryho metoda.....	46
3.3.2.1	Roztoky.....	47
3.3.2.2	Měření koncentrace celkových proteinů.....	47
3.3.3	Metoda TNBSA.....	47
3.3.3.1	Roztoky	47
3.3.3.2	Měření volných aminokyselin kolagenních izolátů.....	47
3.3.3.3	Měření uvolněných aminoskupin při testování fyziologické stability.....	47
3.4	Analýza kolagenů	48
3.4.1	Vertikální elektroforéza proteinů metodou PAGE-SDS	48
3.4.1.1	Roztoky.....	48
3.4.1.2	Příprava polyakrylamidového gelu.....	48
3.4.1.3	Příprava vzorků na elektroforézu.....	49
3.4.1.4	Provedení elektroforézy.....	49
3.4.1.5	Barvení gelu, odbarvení pozadí a vyhodnocení.....	49
3.4.2	Separace pomocí mikrofluidního elektroforetického systému Experion (Bio-Rad, USA)	50
3.4.2.1	Příprava roztoků a vzorků.....	50
3.4.2.2	Nanášení gelu a vzorků na mikročip.....	51
3.4.2.3	Analýza proteinů na mikročipu.....	51
3.4.3	Gelová chromatografie	52
3.4.4	Aminokyselinové složení kolagenových vzorků.....	53
3.5	Studium stability izolovaných kolagenů	53
3.5.1	Testování tepelné stability kolagenů	53
3.5.2	Testování biologické stability kolagenů.....	54
3.5.2.1	Roztoky.....	54

3.5.2.2	Provedení experimentu a způsob analýzy.....	54
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
4.1	Mikroskopie modifikovaných kolagenních materiálů z ÚCHM.....	56
4.2	Měření koncentrace celkových proteinů u modifikovaných kolagenních materiálů	56
4.2.1	Metoda Hartree – Lowryho	57
4.2.2	Biuretová metoda	58
4.3	Izolace kolagenu z různých druhů živočišného materiálu	59
4.3.1	Stanovení obsahu vody v izolovaných preparátech kolagenu.....	61
4.4	Koncentrace bílkovin u izolovaných kolagenních vzorků	62
4.4.1	Měření celkové koncentrace bílkovin a volných aminokyselin v izolovaných kolagenech.....	62
4.4.1.1	Biuretová metoda.....	62
4.4.1.2	Metoda TNBSA	62
4.4.2	Sledování fyziologické stability kolagenových izolátů.....	64
4.4.2.1	Biuretová metoda.....	64
4.4.2.2	Metoda TNBSA	65
4.5	Elektroforetická analýza kolagenů metodou PAGE-SDS	67
4.5.1	Elektroforetická analýza kolagenových standardů, modifikovaných kolagenů a proteinových směsí na 10% gelech	67
4.5.2	Modifikace hustoty polyakrylamidového gelu.....	71
4.5.3	Testování rozpustnosti modifikovaných kolagenových materiálů.....	74
4.5.4	Analýza izolovaných kolagenů metodou PAGE-SDS	77
4.5.5	Sledování vlivu teploty na kolagenové izoláty	81
4.5.6	Testování fyziologické stability kolagenních izolátů metodou PAGE-SDS....	85
4.6	Separace kolagenových vzorků pomocí mikročipové elektroforézy	88
4.7	Gelová chromatografie vzorků kolagenů	94
4.8	Termická analýza kolagenů pomocí ultrazvukové spektroskopie.....	96
4.9	Aminokyselinové složení vzorků kolagenů	99
4.10	Vyhodnocení výsledků z ekonomického hlediska	100
5	ZÁVĚRY.....	102
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	105
7	LITERATURA.....	106

1 ÚVOD

V současné době se intenzivně rozvíjí biomedicínský výzkum v oblasti biomateriálů, které jsou hojně využívány jak k regeneraci tkání, tak i k jejich celkové náhradě, nebo k obnově jejich funkcí. Používané a testované materiály jsou přírodního nebo syntetického původu. Vždy musí být brána v úvahu otázka biokompatibility materiálu, která je tradičně chápána jako materiálem vyvolaná, co možná nejmenší, biologická odezva organismu.

Kolagen je nejvíce se vyskytující protein u všech obratlovců, je nejdůležitější bílkovinou pojivových tkání. Unikátní je zejména svou schopností tvořit velmi pevná, stabilní nerozpustná vlákna se strukturou pravotočivé šroubovice složené ze tří téměř identických, polypeptidových α -řetězců s opakující se aminokyselinovou kompozicí $(\text{Gly-X-Y})_n$. Molekuly kolagenu jsou rozděleny do 21 různých typů, které se liší sekvencí, molekulární hmotností, strukturou i funkcí. Nejčastěji se vyskytuje kolagen typu I a II, a to v kůži, kostech, rohovce, vazivu, šlachách a chrupavkách.

Kolagen, jako materiál přírodního původu, vykazuje velmi slabou antigenicitu (schopnost vyvolat imunologické reakce organismu) a vysokou biodegradabilitu, jelikož degraduje na tělu vlastní peptidy a aminokyseliny, proto je i hojně využíván v lékařství. Jeho biomedicínské aplikace zahrnují použití v léčbě hypertenze, artritidy, urinárních potíží, ran a popálenin, využívá se také v oftalmologii, chirurgii a v tkáňovém inženýrství kůže, kostí a jako náhrada krevních cév a chlopní. Jeho použití se neomezuje pouze na medicínu, ale vyskytuje se i v jiných oborech, jako je potravinářství, kosmetika a farmacie. Hlavním zdrojem průmyslového kolagenu jsou hovězí kůže a kosti, což v posledních letech, především díky BSE (bovinní spongioformní encefalopatie – „nemoc šílených krav“), vyvolává aktivní diskuzi o hledání a využívání alternativních zdrojů kolagenu.

Molekulární charakterizace biopolymerů, bílkovin zvláště, není obvykle snadná. Proteiny jsou skupinou s obrovskou diverzitou, která je dána hlavně množstvím jejich posttranslačních modifikací a tvorbou unikátních terciárních struktur. Dominantní postavení zde mají klasické elektroforetické techniky ke stanovení distribuce velikosti polymerů, popř. jejich podjednotek, dále také kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Stále větší zájem o miniaturizaci procesů zavádí i do této oblasti analýzy proteinů separaci pomocí elektromigračních mikrofluidních systémů.

Cílem předložené diplomové práce je přispět k poznatkům o izolaci kolagenu z alternativních živočišných zdrojů a charakterizovat tyto preparáty ve srovnání s materiály na bázi modifikovaného a surového hovězího kolagenu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kolagen

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů s výjimkou jednobuněčných a patří mezi technicky nejdůležitější vláknité bílkoviny. Je hlavní složkou pojivových tkání, kterým zajišťuje správnou funkci, zejména v souvislosti s jejich mechanickými vlastnostmi. To je dáno jeho specifickou strukturou, charakteristickou vysokým stupněm vnitřní organizace molekul. Kolagen představuje 25 – 30 % všech bílkovin v těle. Tvoří hlavní organickou složku kůže, kostí, chrupavek, šlach a vaziva. Je rovněž významnou součástí cévních stěn, bazálních membrán a rohovek. Má opěrnou a ochrannou funkci a patří, zejména jako složka mezibuněčné hmoty, ke klíčovým proteinům životních pochodů ve zdravém i v nemocném organismu [1].

Kolagen je příkladem rozmanitosti vztahů mezi strukturou a funkcí, které charakterizují vláknité bílkoviny. Zatímco kolagen šlach tvoří vysoce asymetrické struktury s velkou pevností v tahu, kolagen kůže tvoří jen volně spojená ohebná vlákna. Tvrdé oblasti kostí a zubů se skládají z kolagenu, který obsahuje polymer fosforečnanu vápenatého (hydroxyapatitu), zatímco kolagen rohovky oka je tak pravidelně uspořádaný, že je téměř krystalický a průhledný [2].

Kolagen je obnovitelnou surovinou a jeho zdroje jsou téměř neomezené. Je proto snaha neustále zdokonalovat preparáty z něho vyráběné a hledat nové možnosti jejich zpracování a využití. Kromě toho, že je kolagen hlavní surovinou kožedělného průmyslu pro výrobu usní (ročně se zpracují asi 4 mil. tun kolagenu), využívá se v řadě dalších oborů. Přehled využití je uveden v *Tabulka 1*. Četné aplikace vyplývají z „fyziologické blízkosti“ nebo dokonce identity aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem, resorbovatelnosti a schopnosti zadržovat vodu [1].

Tabulka 1: Strukturní hierarchie kolagenu a přiřazené obory použití [1]

Strukturní rovina	Obor použití / produkty
Pletivo vláken / plocha	výroba usní, krytí ran, náhrada pokožky (kožní implantáty), náhrada cév
Vlákna	střívka z kolagenových past, obalové fólie, membrány, hemostyptika, prášek na rány
Fibrily	biokompatibilní plastové nebo keramické materiály, kostní a čelistní chirurgie
Makromolekuly	nativní kolagen, atelokolagen, desamidokolagen pro kosmetiku a medicínu
Polypeptidy	želatina, klíh, hydrolyzáty kolagenu, expandéry plasmy, kapsule, želatinační prostředky, tensidy, emulgátory, zahušřovadla, krmiva, hnojiva

2.1.1 Makromolekulární charakter kolagenu

Charakteristickou vlastností molekuly kolagenu je pevnost a trojřetězcová helikální (spirálovitá) struktura. Tři kolagenové polypeptidové makromolekuly, nazývané α -řetězce

(z nichž každý obsahuje kolem 1000 aminokyselinových zbytků a měří asi 280 nm), se společně stáčí do pravidelné pravotočivé superšroubovice. Úplná otáčka trojitě spirály obsahuje 30 AMK zbytků. Superšroubovice tak tvoří kolagenovou molekulu s délkou asi 300 nm a průměrem 1,5 nm. α -Řetězce jsou spirálovitě stočeny ve směru od N-koncové skupiny k C-koncové skupině a jsou levotočivé. Molekuly jsou extrémně bohaté na glycin (26 až 28 %) a prolin (nad 15 %). Z prostorových důvodů leží glycinové zbytky uvnitř trojitě spirály (jsou dostatečně malé pro obsazení vnitřního prostoru) a tím umožňují, aby se tři α -řetězce těsně semkly do konečného kolagenového superhelixu [1].

Motiv primární struktury unikátní pro kolagen je (Gly-X-Pro)_n nebo (Gly-X-Hyp)_n; každou třetí aminokyselinou je glycin, kterému předchází prolin nebo hydroxyprolin. Všechny tři AMK mají klíčové strukturní role. Konfirmace obsahující prolin a hydroxyprolin jsou neohebné, tyto AMK dodávají vláknu rigiditu. Spolu s amidovým dusíkem a atomy O se na vzniku vodíkových vazeb, stabilizujících trojitou šroubovici, podílejí –OH skupiny hydroxyprolinu. Hydroxylové skupiny hydroxylysinu slouží jako místa připojení cukrů [2].

Existuje několik typů kolagenů, navzájem se lišících především složením AMK (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Typy a výskyt známých kolagenů [3]

Typ	α -Řetězce	Výskyt
I	α_1, α_2	kosti, šlachy, vazivo, rohovka, dermis
II	α_1	hyalinní chrupavky
III	α_1	kůže, cévní stěny, roztažitelné tkáně
IV	$\alpha_1 - \alpha_6$	bazální membrány
V	$\alpha_1 - \alpha_3$	jako typ I, ale v menším podílu
VI	$\alpha_1 - \alpha_3$	dermis, chrupavky, placenta, plíce, meziobratlové ploténky
VII	α_1	spojení kůže-pokožka, pochva, ústní sliznice
VIII	α_1, α_2	některé endotelické buňky
IX	$\alpha_1 - \alpha_3$	chrupavky, rohovka
X	α_3	fetální nebo juvenilní chrupavky
XI	$\alpha_1 - \alpha_3$	chrupavky
XII	α_1	vazivo, šlachy, perichondrium
XIII	α_1	pokožka, vlasové folikuly, střevo, játra, plíce
XIV	α_1	kůže, šlachy, cévní stěny, placenta, plíce
XV	α_1	fibroblasty (vazivové buňky), buňky hladkého svalstva, ledviny, slinivka
XVI	α_1	fibroblasty, keratinocyty, zárodečná blána
XVII	α_1	spojení kůže-pokožka
XVIII	α_1	plíce, játra
XIX	α_1	zhoubný nádor z příčně pruhované svaloviny
XX	α_1	embryonální pokožka, hrudní chrupavky, šlachy
XXI	α_1	cévní stěny

Pozn.: Existuje několik podtypů každého α -řetězce.

2.1.2 Degradace kolagenu [1]

Kolageny jsou neustále, i když pomalu, degradovány specifickými mimobuněčnými enzymy, tzv. kolagenázami. Po vyloučení jsou propeptidy prokolagenových molekul odstraněny specifickými proteolytickými enzymy mimo buňku. Tyto přeměňují

prokolagenové molekuly na molekuly kolagenu, také nazývaného tropokolagen (1,5 nm v průměru), které se spojují v mimobuněčném prostoru za tvorby rozměrnějších kolagenových fibril (10-300 nm v průměru). Hnací silou tvorby fibril je do jisté míry tendence kolagenu k samoseskupování. Propeptidy mají alespoň dvě funkce: 1) usměrňují vnitrobuněčnou tvorbu trojřetězcových kolagenových molekul, 2) protože jsou odstraněny až po sekreci, zabraňují nitrobuněčné tvorbě velkých kolagenových fibril, která by mohla být pro buňku fatální.

Organizace kolagenových fibril v mezibuněčné hmotě je přizpůsobena potřebám tkáně. Fibrily mají různé průměry a jsou v různých tkáních odlišně organizovány. V savčí kůži např. jsou „tkány“ tak, aby odolávaly napětí ve všech směrech. Ve šlachách jsou organizovány do paralelních svazků podél hlavní osy napětí působícího na šlachu. U dospělé kosti a rohovky vytvářejí pravidelně vrstvené struktury podobné překližce, přičemž jednotlivé vrstvy jsou na sebe kolmé. Pojivové tkáně samy určují velikost a uspořádání kolagenových fibril.

2.1.2.1 Hydrolytická degradace

Kolagen v roztoku podléhá progresivní hydrolytické degradaci doprovázené ztrátou mnoha fyzikálních vlastností. Rychlost tohoto procesu je závislá na teplotě, pH systému a v menší míře na vnitřním tlaku roztoku a povaze dalších rozpouštědel, které mohou být přítomny. S teplotou rychlost hydrolýzy roste. Při neutrálním pH postupuje degradace pomaleji, s pohybem na obě strany rychlost roste. Kromě hydrolýzy příčných kovalentních, převážně esterových vazeb, probíhá současně štěpení peptidických vazeb v polypeptidovém řetězci. Při alkalické hydrolýze je toto štěpení mírnější. Při kyselé hydrolýze je štěpení obou typů vazeb přibližně stejné.

2.1.2.2 Enzymatická degradace

Některé studie ukázaly, že nativní kolagen je vůči působení běžných proteolytických enzymů odolný, s výjimkou určitých enzymů bakteriálního nebo hmyzího původu, tzv. kolagenáz, které specificky štěpí peptidové řetězce nativního kolagenu. Patří mezi ně např. enzymy izolované z bakterií *Clostridium perfringens* a *Cl. histolyticum*. Jiná situace však nastává při vyšší teplotě, kdy se v roztoku rozpadá sekundární struktura kolagenu. Každý peptidový řetězec je pak schopen zaujmout větší počet konformací s přibližně stejnou energií a nemá stálou orientaci. Tehdy mohou peptidové segmenty přizpůsobit svou orientaci aktivnímu centru enzymu a stát se tak přístupné téměř všem proteolytickým enzymům. Ty přednostně hydrolyzují vazby s aromatickými zbytky, některé, jako trypsin, štěpí peptidové vazby, estery a amidy.

2.1.2.3 Oxidační štěpení

Oxidační štěpení je složitější než hydrolytická degradace. Studium vlivu oxidačních činidel, jako je např. peroxid vodíku, jodistan sodný, bromnan sodný a železokyanatan sodný, ukázalo, že se jejich reakce s kolagenem navzájem značně liší. Degradace je založena na ataku příslušného činidla na sacharidy obsažené v kolagenu. Štěpení kyselinou jodistou je doprovázeno mírným úbytkem volných aminoskupin (van Slykova analýza) a prudkým poklesem obsahu hexosy. Ztráta aminoskupin odpovídá sníženému obsahu hydroxylysinu v kyselé rozpustném kolagenu.

2.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti kolagenu [1]

2.1.3.1 *Polyelektrolytický charakter*

Kolagen, podobně i jako jiné bílkoviny, má charakter amfoterního polyelektrolytu. Jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. To znamená, že část skupin postranních řetězců se ionizuje v alkalické a část v kyselé oblasti pH. Náboj kolagenové molekuly se mění se změnou pH; v silně kyselé oblasti má kladný náboj, v silně alkalické záporný. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7. Mírnými účinky chemikálií se mění v rozsahu pH 4,5 až 8,0. Většina fyzikálně chemických vlastností vykazuje v této oblasti extrémní hodnoty. Jako izoiontový bod je označována hodnota pH, při níž počet protonů připojených ke skupinám –NH₂ bílkoviny se rovná počtu protonů oddisociovaných ze skupin –COOH. Proto se bílkovina čistí dialýzou, aby neobsahovala žádné jiné ionty. Hodnota pH se potom charakterizuje jako izoiontový bod.

2.1.3.2 *Botnání*

Z fyzikálně chemického hlediska patří kolagen k přechodným koloidním soustavám – gelům. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost botnat. Po ponoření do vody vlákno kolagenu omezeně botná (exotermní proces); přitom dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. Část vody obsažené v nabotnalém kolagenu tvoří tzv. botnací voda, kterou lze mechanickým účinkem odstranit, druhou část tvoří voda hydratační, koloidně vázaná, odstranitelná jen sušením.

Z hlediska mechanismu lze rozlišit botnání osmotické (nábojové) a lyotropní. Při osmotickém botnání proniká voda styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem následkem gradientu osmotického tlaku. Ten je dán rozdílem koncentrací všech pohyblivých iontů ve vnitřní fázi (gelu) a ve vnější fázi (roztoku). Po určité době se ustaví rovnováha – tzv. Donnanova membránová rovnováha, kdy botnací tlak je právě vykompenzován pevností makromolekulární sítě. Rozrušení stabilizujících vazeb (působením extrémní hodnoty pH nebo lyotropních činidel) sníží protitlak pevné fáze proti průniku vody a rovnováhy se dosáhne při vyšším stupni nabotnání (lyotropní botnání). Sloučeniny způsobující tento druh botnání mají schopnost štěpit vodíkové vazby a v extrémním případě až rozpouštět kolagen.

2.1.3.3 *Denaturace a renaturace*

Vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem ztrácejí bílkoviny své původní nativní vlastnosti – denaturují. Denurací kolagenu vzniká želatina. Orechovič a Spikiter zjistili, že produktem denaturační reakce vodného roztoku tropokolagenu jsou dva štěpy lišící se molekulovou hmotností, a označili je jako komponenty α a β . Komponentu β lze dále rozštěpit na dvě komponenty α . Vznikají tedy tři štěpy odpovídající trojitě spirále molekuly kolagenu. Mechanismus denaturace tropokolagenu je dvoustupňový proces. Nejdříve nastane zborcení trojitě spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statistického klubka, v němž jsou jednotlivé řetězce navzájem ještě spojeny. V druhém stupni se tato klubka rozpadávají na tři frakce: frakci α tvořící jeden polypeptidický řetězec původní spirály, frakci β tvořící dva dosud spojené řetězce a frakci γ , kterou tvoří tři řetězce v nezměněné formě statistického klubka. Zůstane-li denaturovaný roztok tropokolagenu stát delší dobu při nízké teplotě, probíhá zčásti proces renaturace, tj. zpětná rekonstrukce spirálové konfigurace.

2.1.3.4 Hydrotermální stabilita

Při zahřívání kolagenových vláken ve vodě dochází k jejich zkrácení asi o 1/3 vlákna ve směru osy. Tato termická kontrakce je charakterizována teplotou smrštění T_s . Příčinou smrštění je štěpení intermolekulárních příčných vazeb a rovněž intramolekulárních vazeb (kdy nastává denaturace kolagenu), které udržují trojitě spirály v nativním kolagenovém vlákně v nataženém stavu. T_s kolagenu se považuje za tání kolagenu v krystalických oblastech. Rovněž lyotropní činidla, štěpící vodíkové vazby, způsobují kontrakci kolagenového vlákna a snižují hodnoty T_s . K určení stability trojhelikální struktury se využívá obvykle měření teploty T_d , tj. denaturační teploty přechodu kolagen – želatina, který jako fázová přeměna prvního řádu má kladné a výrazné ΔH . Hodnoty obou teplot lze v určitém rozsahu zvýšit zesíťováním kolagenu; tak např. u kolagenu vyčiněného glutaraldehydem jsou nacházeny hodnoty T_s kolem 70 °C, naproti tomu u nativního kolagenu 37 °C.

2.1.3.5 Hydratace kolagenu

Proteiny obsahují dva typy hydrofilních center schopných vázat vodu elektrostatickými silami a vodíkovými vazbami: 1) polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých AMK zbytků, 2) dusík a kyslík peptidické vazby. Pro udržení fyzikálních vlastností kolagenu je nutná asociace určitého minimálního množství vody, tvořícího přibližně 20 % jeho hmotnosti. V plně hydratovaném stavu kolagenu se uvolňuje pohybové omezení peptidových řetězců protofibril, typické pro suchý stav, čímž se vysvětluje elementární funkce vody pro fyzikální vlastnosti proteinu. Vzdálenost mezi sousedními polypeptidovými řetězci suchého kolagenu je 1 nm, hydratací se tato vzdálenost zvyšuje na 1,5 až 1,6 nm.

2.1.3.6 Přeměna na želatinu

Zahříváním kolagenu ve vodném prostředí vzniká želatina. Z hlediska teoretických představ přeměny kolagenu na želatinu rozeznáváme tři pochody: 1) štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb na úrovni kvartérní struktury, 2) denaturace na úrovni terciární struktury, 3) hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců na molekulární úrovni. Zásah do struktury polypeptidového řetězce má charakter degradace, depolymerace a je jevem nežádoucím: čím méně těchto vazeb je rozštěpeno, tím lepší fyzikálně chemické vlastnosti želatina má.

Typickou vlastností želatiny je přechod sol – gel. Gel želatiny jeví tixotropii, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází na sol. Je to přeměna inverzní, nikoli však vratná:



Z hlediska složení AMK je možné želatinu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu. Jsou odstraněny nevláknité bílkoviny, mukopolysacharidy a tuky. U želatiny připravené alkalicky dochází k poklesu koncentrace argininu, tyrosinu a anodicky vázaného dusíku. Kysele připravená želatina se proto více blíží AMK složení kolagenu.

2.1.4 Roztok kolagenu [1]

Již na počátku století bylo zjištěno, že některé kolageny lze rozpustit ve studeném zředěném roztoku kyseliny octové. Fyzikálně chemické studie rozpustných kolagenů (rozptyl světla, osmometrie, viskozimetre, dvojlom světla) umožnily blíže charakterizovat

tropokolagen. V dostatečně nízké koncentraci existuje rozpustný kolagen ve zředěných roztocích organických kyselin ve formě protáhlých tenkých tyčinek o délce 280 nm, průměru 1,6 nm a relativní molekulové hmotnosti podle různých autorů od 265 000 do 300 000. Později byla popsána další třída rozpustných kolagenů získaných extrakcí ve studených, slabě alkalických roztocích solí nebo neutrálních roztocích solí s hypertonickou a fyziologickou iontovou silou. V nativní formě je možné rozpustit jen agregační formy kolagenu, které ještě neobsahují intermolekulární příčné kovalentní vazby. Nerozpustný kolagen z tkání starších jedinců lze rozpustit po předchozí úpravě, při níž se rozštěpí část intermolekulárních příčných vazeb a nastane částečná nebo celková chemická nebo tepelná denaturace. Rozpustnost kolagenu také závisí na stupni zralosti tkáně. Z tkání mladých jedinců je možné rozpustit 10 až 15 % kolagenu; stárnutím vaziva rozpustnost klesá. Výzkumy ukazují, že pro použití kolagenu jako biomateriálu je alkalická úprava účinnější než kyselá, protože pozitivně ovlivňuje termální stabilitu kolagenu a znemožňuje tvorbu fibril při neutrálním pH ve fyziologických podmínkách.

2.1.5 Biomedicínké aplikace kolagenu [1]

Použití kolagenu má svůj původ ve „fyziologické blízkosti“ nebo dokonce identitě aplikovaného kolagenu s tělesným kolagenem „příjemce“, v jeho resorbovatelnosti, která se dá řídit síťovacími reakcemi, a ve vysoké absorpční schopnosti, která je podporována značným vnitřním povrchem (několik m^2/cm^3) a snadno přístupnými reakčními skupinami. Výhodou je, že se dá vyrobit velmi čistý, což platí zejména pro rozpustné kolageny. Ukazuje se, že použití kolagenů má více předností. Jako nespecifický polymer, nacházející se ve stejné formě u různých druhů savců, vykazuje velmi nízkou antigenitu, nevyvolává tvorbu protilátek organismu. Při působení specifických enzymů na molekuly kolagenu se odstraní telopeptidy z konců řetězců a antigenita se potlačí ještě více. Kolagen může být i nosičem léčiv nebo stimulujících látek, které se lokálně dostávají do rány a postupně se během hojení uvolňují. O tuto skupinu biomateriálů je proto v současnosti mimořádný zájem. Nevýhodou systémů na bázi kolagenu je jejich nízká odolnost vůči enzymatické degradaci. Proto je nutné kompozitní systémy stabilizovat, např. přidávkou různých typů zhušťovačů nebo lapačů reaktivních radikálových meziproductů enzymatických reakcí.

Tabulka 3: Kolagenové medicínské preparáty podle druhu a oboru použití

Výrobky	Použití
Šicí vlákna – catgut	chirurgický šicí materiál zakrývání ran/léčení ran
Kolagenová vlákna – z roztoků – ze suspenzí – z membrán	zastavování krvácení (hemostatika) náhrada pokožky náhrada cév/vykládání cév
Kolagenové plochy – přirozená pokožka – membrány, bandáže – netkané textilie – pěny/houby	orgánové implantáty plniva pro implantáty

Cévy/orgány	vazivové opravy lepení tkání proliferace buněk
Kolagenové prášky, lepidla, pudry a spreje	péče o pleť

Ze střev stočená šicí vlákna („catgut“) patří již staletí k chirurgickému náčiní. Přes rostoucí význam syntetických šicích vláken, např. na bázi polyamidu, polyesteru nebo polymerů kyseliny mléčné, která nejsou absorbovatelná nebo jsou zpožděně resorbovatelná, fyziologicky jsou absolutně indiferentní a většinou levnější, má catgut své pevné místo na operačním sále. Jeho resorbovatelnost se řídí zesít'ováním solemi chromu.

Kolagenové plochy se v medicíně používají buď jako přírodní vláknenné pletivo (kožní štípenky), jako netkané textilie nebo fixované pěny, přičemž cesta k oběma posledně jmenovaným kategoriím vede buď přes mechanické rozmělnění vláknenného pletiva nebo přes rekonstituci z roztoku. Kožní štípenky, zbavené nekolagenových součástí do značné míry alkalickou, kyselou nebo enzymatickou úpravou, vysušené zmrazením a sterilizované radiačně-chemicky, se používají k zakrytí ran, především popálenin. Rovněž disperze kolagenových vláken formované do membrán se hodí k dočasnému zakrytí rány. V kolagenových membránách mohou být inkorporovány i baktericidní přísady a látky, které podporují růst kostí. Práškový kolagen byl zpracován do spreje, který lze nastříkat na rány jako bandáž. Membrány z atelokolagenu (kolagen enzymaticky zbavený koncových rozvětvených částí molekul, tzv. telopeptidů) se používají nejen k zakrývání ran, ale i k opravě cév, náhradě šlach a pro pěstování buněčných kultur *in vitro*. Obávanému vysušení ran zakrytých kolagenem je možno zabránit mj. kombinací s plastovou fólií, která pokrývá povrch a je prodyšná (např. Goretex nebo Poromeriks). Netkané textilie z kolagenu se užívají pro zastavení krvácení. Hemostyptika na bázi kolagenu dnes patří k základnímu vybavení při hojení operačních ran, patří sem např. výrobky firmy HYPRO, Otrokovice. Resorbovatelnost kolagenu se dá řídit síťujícími reakcemi, např. reakcí s již zmiňovaným glutaraldehydem. Houbovité resorbovatelné polymery, např. na bázi kyseliny mléčné, je možné plnit atelokolagenem z vepřové kůže a používat jako náhradu pokožky.

I když v současné době stále více převládají syntetické cévní a orgánové protézy, přesto se vždy uvažuje kombinace s rozpustným kolagenem, aby se optimálně redukovala propustnost cév, podnítil růst buněk a zlepšila biokompatibilita protéz s živou tkání. Navrhují se nové látkové kombinace: např. vytlačované teflonové hadice s velkou pórovitostí mohou být opatřeny „vnitřním vyložením“ směsí chitosanu a kolagenu, nebo roubovací polymerace kolagenu na polytereftalátové protézy pomocí kyseliny akrylové. Kolagenová vlákna kombinovaná s fosforečnanem vápenatým se s výhodou používají jako náhrada kostí a zubů. Přídavek zydermu (vstříkovaného kolagenu) k fosforečnanu vápenatému podporuje léčení kostí více než pouhá výplň z hydroxyapatitu. Jako příklad může sloužit kompozitní materiál obsahující hydroxyapatit a atelokolagen, určený na výplně různých kostních defektů, vyvinutý na Chemickotechnologické fakultě STU v Bratislavě pod názvem BIOVAK. Atelokolagen v kompozitu vyvolá rychlejší prorůstání implantátu novou kostí a potlačuje tvorbu fibrózní vrstvy na jejich rozhraní. Další aplikační výhodou takového kompozitu je jeho tvarovatelnost při současném zachování kompaktnosti.

Nejnovější vývoj léčení ran se týká použití mikrokapslí (fibrilovaný kolagen v podobě koacervátu), upravených roztoky polysacharidů a růstovými buněčnými faktory. Zájem si zasluhuje výroba kolagenových částic v rozsahu mikro- a nanometrů, které jsou „napuštěny“

účinnou látkou a dají se vstříkovat. V chirurgii získává stále větší význam lepení místo šití. K tradičním fibrinovým lepidlům se nyní přidružují kolagenová lepidla, která se připravují reakcí kolagenu s kyselinou antrachinon-1,5-disulfonovou a anhydridem kyseliny glutarové. Značná pozornost je u medicínských aplikací kolagenu věnována také zábraně alergických reakcí. Aktuální je potahování syntetických polymerních náhrad a příprava kontaktních čoček v kombinaci s polyakryláty.

2.2 Biokompatibilita a biomateriály

2.2.1 Úvod a definice

Otázka biokompatibility vyvstává z rozpoznání závažných rozdílů mezi živou tkání a neživými materiály. Z pohledu historie a praxe je zřejmé, že se objevuje velká řada interakcí mezi tkání a materiály. V každé z těchto interakcí lze nalézt jak užitečné, tak i nepříznivé efekty. Např. materiály považované za potraviny a nápoje mohou být buď nutriční nebo nevyživové. Z jiného pohledu je lze také považovat za toxické nebo netoxické. Tato tvrzení jsou ale užívána, popř. zneužívána spíše relativně. Nejde o žádnou absolutní stupnici. Např. ačkoliv alkohol negativně ovlivňuje centrální nervový systém, v malých dávkách má pozitivní účinek jako stimulant odbourávající zábrany a „společenské narkotikum“. Vnitřně užívané velké dávky jsou toxické až letální. Nicméně i v toxických dávkách je alkohol užitečný jako zevní desinfekce [4].

Biomateriály jsou materiály přírodního původu i vyrobené člověkem, které jsou používány buď přímo jako živá tkáň, nebo její doplnění, popř. k nahrazení funkcí. Když tyto materiály vyvolají minimální biologickou odezvu, bývají označovány jako biokompatibilní. Ačkoliv je tento termín obecně používaný, je nemístný a obsahově chybný. Kompatibilita je striktně schopnost harmonické interakce. Takže pojem biokompatibilita naznačuje, že materiál vykazuje obecně „dobré“ nebo harmonické chování ve styku s tkání a tělními tekutinami, což není tvrzení zcela opodstatněné [4].

Tradiční pojetí biokompatibility se v zásadě vztahuje na vliv materiálu na biologický systém, efekt biologických procesů na materiály se do tohoto pojetí řadí výjimečně, pokud ovšem výsledek materiálových změn nevyvolá biologickou odezvu. Vliv biologického systému na materiál se obvykle shrnuje termínem biodegradace, který zase naznačuje jakési „špatné“ chování – opět bez opodstatnění. Např. v případě implantace stehů, je biodegradace vysoce žádoucí výsledek [4].

Záležitost biokompatibility v praxi nemluví o existenci nepříznivé biologické reakce na materiál, ale spíše zda se tento materiál zhostí své role uspokojivě (tj. zamýšleným způsobem) v dané biomedicínské aplikaci a může být tudíž považován za úspěšný biomateriál [4].

Autor k popisu materiálů přijal termín „biological performance“ (biologické parametry, souhrn vlastností), aby mohl nahradit historickou a klasickou představu biokompatibility [4].

Souhrn biologických vlastností (parametrů) označuje interakce mezi materiály a živými systémy. Dva aspekty těchto parametrů jsou:

- Hostitelská odezva: lokální a systémová odezva (jiná než zamýšlená terapeutická odezva) živého systému na materiál
- Materiální odezva: odezva materiálu na živý systém [4].

K správnému pochopení termínu biokompatibility je třeba definovat další pojmy:

- Referenční (kontrolní) materiál: materiál, který byl standardními testy určen k vyvolání reprodukovatelné, kvantifikovatelné odezvy hostitele nebo materiálu
- Úroveň (stupeň) hostitelské/materiálové odezvy: síla hostitelské/materiální odezvy ve standardním testu s ohledem na odezvu získanou s použitím referenčního materiálu
- Standardní test: jakýkoliv přesně definovaný, opakovatelný test [4].

Termín biokompatibilita se stále udržuje z historických důvodů, ale s následující užší a důkladnou redefinicí:

- Biokompatibilní (biokompatibilita): souhrn biologických vlastností ve specifické aplikaci, tj. posuzování přiměřené dané situaci [4],

nebo obdobně:

- Biokompatibilita je schopnost materiálu účinkovat s přiměřenou hostitelskou odezvou ve specifickém použití,

přičemž příkladem „přiměřené hostitelské odezvy ve specifickém použití“ může být mírná zánětlivá odezva, nebo minimální adsorpce proteinů na kardiovaskulární stent [5].

Tradiční definice „biomateriálu“ vyvinutá v roce 1986 a často zmiňovaná v literatuře je [5], [6]:

- Biomateriál je neživý materiál používaný v lékařských pomůckách (nástrojích, přístrojích) určený k interakci s biologickým systémem.

Další vyskytující se definice v souvislosti s biomateriály jsou:

- Biomateriál: neživý materiál používaný ve zdravotnictví k vyvolání interakce s biologickým systémem
- Biomateriál: materiál určený k propojení s biologickým systémem k hodnocení, ošetření, rozšíření nebo nahrazení jakékoliv tkáně, orgánu, nebo funkce těla
- Biomateriály jako vědní obor: organizované studium vlastností materiálů, tkání a orgánů živých organismů; vývoj a charakterizace farmakologických inertních materiálů k měření, obnovení a zlepšení funkcí v těchto organismech; a interakce mezi životaschopnými a neživými materiály [4].

Současný vývoj materiálů zahrnuje i živé buňky (např. umělé orgány a tzv. tkáňové „scaffoldy“ – skelety, kostry), což vylučuje slovo „neživé“ v tradiční definici biomateriálu [3].

Úspěšný návrh a vývoj biomateriálů také vyžaduje syntézu materiálů, charakterizaci fyzikálních a mechanických vlastností, což je typická oblast dovedností pro chemiky, materiální vědce a chemické inženýry. Příkladem důležitých fyzikálních a mechanických vlastností může být porosita, adheze proteinů, kontaktní úhel, modul elasticity, tažná síla, elongace a zlom, trvanlivost a *in vivo* stabilita. V ideálním případě jsou vlastnosti biomateriálu, včleněného do implantátu nebo přístroje, přizpůsobené požadavkům konkrétního použití. Např. kyčelní protéza musí být silná, pevná, odolná, nedegradabilní *in vivo*. Naopak výplň kostní tkáně musí být porosná, napomáhající kosti a degradovat musí rychlostí poměrnou k hojení zlomeniny [3].

Existuje organizace ve Spojených státech - FDA (Food and Drug Administration), která reguluje implantáty do lidského těla k zajištění jejich bezpečnosti a efektivnosti. K dokázání bezpečnosti biomateriálu musí být provedeno množství biologických a klinických testů, aby vyhověl regulačním požadavkům, proto komercializace nového produktu vyžaduje

významnou investici. FDA nereguluje ani tak schvalování biomateriálů, ale spíše jejich užívání ve finální, konečné etapě jako užívání lékařské pomůcky, tzn. produkt [3].

2.2.2 Materiály pro lékařské pomůcky (komponenty) a jejich složky [3]

První úvahou při výběru biomateriálu k návrhu a výrobě pomůcky musí být jeho vhodnost k zamýšlenému účelu s ohledem na jeho charakteristiky a vlastnosti. Ty zahrnují chemické, toxikologické, fyzikální, elektrické, morfologické a mechanické vlastnosti. Ke stanovení celkové *in vivo* tkáňové kompatibility biomateriálu, nebo lékařské pomůcky, je důležitá znalost chemického složení materiálu, a to včetně podmínek expozice ke tkáni, povahy, míry, četnosti a stálosti exponované pomůcky a jejích součástí ke tkáni, ve které má být použita. *Tabulka 4* představuje seznam komponent biomateriálů a charakteristik, které mohou ovlivnit celkovou biologickou odezvu lékařské pomůcky.

Tabulka 4: Biomateriály a jejich komponenty

Materiál(y) z výroby
Úmyslná aditiva, procesní kontaminanty a rezidua
Vyluhovatelné látky
Degradační produkty
Další složky a jejich interakce ve finálním produktu
Vlastnosti a charakteristiky finálního produktu

Znalost přítomnosti a kvantity těchto komponent v lékařské pomůcce, tj. ve finálním produktu, je nezbytná. Rozsah potenciálních biologických rizik je velký a může zahrnovat krátkodobé i dlouhodobé efekty, nebo speciální toxické účinky, které musí být zvažovány pro každý materiál a lékařskou pomůcku.

Složky biomateriálů mohou hrát nepředvídatelnou roli v biokompatibilitě materiálů. Nízkomolekulární látky jako aditiva, procesní kontaminanty, rezidua, vyluhovatelné látky a degradační produkty mohou migrovat a difundovat z povrchu materiálu, nebo z nátěru povrchu materiálu, což může vést k různým jiným biologickým interakcím, než které byly zamýšlené u původního materiálu. Existuje také možnost, že tyto nízkomolekulární látky budou difundovat z vnitřku materiálu k jeho povrchu při kontaktu s tkání, až se mohou uvolnit do tkáně, což může vést ke změně nebo nežádoucí tkáňové reakci. Krátkodobá biologická analýza biomateriálu nedokáže identifikovat takovou možnost, která vyžaduje delší čas. Proto by mělo být nezbytné dlouhodobé *in vivo* sledování a zrychlené *in vitro* procedury.

Jelikož finální produkt je většinou dostupný ve sterilním stavu, musí být zvažovány také sterilační techniky a efekt sterilizace. Sterilizace párou, ozářením nebo ethylenoxidem může vést k modifikaci vlastností materiálu, a to může mít dopad na biokompatibilitu. Sterilizace ozářením může síťovat nebo degradovat polymery, což vede k změně vlastností. Rezidua ethylenoxidu jsou známá pro nepříznivé reakce v *in vitro* testech toxicity. Z těchto důvodů je nezbytná charakterizace finálního produktu, která následuje až po sterilizaci.

Přesto, testování na všechna potenciální rizika nebývá nutné, ani praktické. Pokud je například materiál i jeho složky dobře známé, a jeho výroba, zpracování a sterilační techniky již byly charakterizovány vzhledem k potenciálním změnám materiálu nebo biokompatibilitě, testování není nezbytné.

2.2.3 *In vitro* testování biokompatibility [3]

Nejběžnější testování biokompatibility je za použití buněčných kultur, přičemž se testuje nejčastěji cytotoxicita, buněčná adheze, buněčná aktivace nebo buněčná smrt. Buněčné kultury bývají požadovány i pro stanovení biokompatibility finálních produktů v medicíně, tzn. biomateriálů, lékařských pomůcek a protéz [7], [8], [9].

Používají se nejčastěji tři typy testování na buněčných kulturách: přímý kontakt, difúze agarem a roztok extraktu. Přímý kontakt nejčastěji používají výzkumníci pro studium biokompatibility nových biomateriálů, přičemž bývá použitý ten typ buněk, pro které jsou biomateriály určeny v klinické praxi. To je značná výhoda tohoto typu testování. Použitím vhodných materiálů jako negativních a pozitivních kontrol, nebo jiných biomateriálů určených k podobné aplikaci, mohou být nové biomateriály otestovány pro široké spektrum typů buněčných interakcí.

Testování cytotoxicity a buněčných interakcí pomocí extraktu vyžaduje extrakci biomateriálu rozpouštědlem, často se používá sada jak hydrofilních, tak hydrofobních rozpouštědel. Toto stanovení především umožňuje identifikovat a charakterizovat cytotoxické komponenty v biomateriálech a také poskytuje korelaci k *in vivo* testování, jako je např. test přecitlivělosti, podráždění, intradermální reaktivity a další testy, kdy je vyžadována injekce extraktu.

Testování cytotoxicity *in vitro* bývá počátečním screeninem biokompatibility pro velkou škálu biomateriálů užívaných v lékařství. Teprve poté se provádějí další specifické aplikační testy k ohodnocení biokompatibility za konečných podmínek. Obecně, biomateriály, které jsou identifikované *in vitro* jako netoxické, budou netoxické i v *in vivo* testování. Biomateriály označené v *in vitro* testu jako toxické, musí být dále zkoumány pro přijatelnost do kliniky.

Příkladem v lékařské praxi užívaného biomateriálu s identifikovaným nízkým stupněm toxicity je glutaraldehydem fixovaná prasečí chlopeň. Tento materiál se, i přes negativní výsledek *in vitro* testování, stále používá ve vývoji protéz srdečních chlopní pro klinické použití. Je to příklad, kde riskování nízké toxicity je převáženo klinickou výhodou užití tohoto materiálu.

2.2.4 *In vivo* testování biokompatibility [3]

Z praktického hlediska je *in vivo* testování biokompatibility biomateriálů a lékařských pomůcek prováděno ke zjištění, zda daná pomůcka plní zamýšlenou funkci, tj. nepředstavuje pro pacienta nebo uživatele žádnou výraznou újmu. Cílem tohoto testování je tedy předvídat simulaci podmínek klinického použití, zda pomůcka bude uživateli způsobovat nějaké poškození. K usnadnění výběru vhodných testů jsou lékařské pomůcky a biomateriály rozděleny podle charakteru a délky trvání jejich kontaktu s tělem.

Existují dvě perspektivy *in vivo* testování, první z nich slouží ke stanovení obecné biokompatibility nově vyvinutého biomateriálu, kde je nezbytné vědět určité poznatky o tkáňové kompatibilitě pro další výzkum a vývoj. V takové situaci posléze nemusí vůbec dojít k výrobě finálního produktu. Obecně je ale doporučováno provést identifikaci a kvantifikaci extrahovatelných chemických látek z lékařské pomůcky před biologickým hodnocením. Je docela obvyklé provádět předběžné *in vivo* testování ke zjištění možné přítomnosti neznámých chemických látek způsobujících nežádoucí biologické reakce.

Samozřejmě tyto negativní reakce, zjištěné na úrovni vývoje, vedou k další snaze vylepšit biokompatibilitu daného biomateriálu a identifikovat látky zodpovědné za nežádoucí odezvu.

Druhý přístup je zaměřený na biokompatibilitu finálního produktu, tj. lékařské pomůcky a jejich dílčích materiálů za podmínek, ve kterých je implantována. Lékařské pomůcky ve finální formě jsou ke stanovení správné funkce a biokompatibility implantovány do pečlivě vybíraných zvířecích modelů. Přitom nemusí být provedeny všechny doporučené testy pro schválení pomůcky. V těchto situacích mohou být některá testování provedena na částech pomůcky nebo materiálech, které jsou připraveny za správných výrobních a sterilačních podmínek.

Tabulka 5 uvádí obecné typy *in vivo* testů. Konečný výběr testů ke stanovení biokompatibility je založen na charakteristikách a konečném použití pomůcky, nebo uvažovaného biomateriálu.

Tabulka 5: In vivo testy biokompatibility

Přecitlivělost (alergizace)
Podrážděnost
Intradermální reaktivita
Systémová toxicita (akutní toxicita)
Subchronická toxicita (subakutní toxicita)
Genotoxicita
Implantace
Hemokompatibilita
Chronická toxicita
Karcinogenita
Reprodukční a vývojová toxicita
Biodegradace
Imunitní odezva

2.2.4.1 Přecitlivělost, podrážděnost a intradermální reaktivita

K alergickým reakcím může docházet při vystavení tkáně už nepatrným množstvím potenciálně vyluhovatelných látek z biomateriálu nebo lékařské pomůcky. Obvykle se testy provádějí na morčatech a používají se extrakty z biomateriálů, přičemž musí být bráno v úvahu nejen zamýšlené místo použití v klinické praxi (kůže, oči, sliznice), ale i stupeň, četnost, trvání a podmínky expozice. Testy intradermální reaktivity vymezují lokální reakci tkáně na extrakt z lékařské pomůcky, popř. biomateriálu, nebo přímo na protézu jako finální produkt. Tyto testy bývají aplikovány, pokud není vhodné testování na kůži a sliznicích, nejčastěji se využívají albínští králíci.

Jelikož toto testování je založeno na stanovení biologické odezvy na vyluhovatelné látky, které mohou být přítomny v biomateriálech, je kritickým bodem testů volba rozpouštědla k přípravě injekčního roztoku.

2.2.4.2 Systémová (akutní) toxicita, subakutní a subchronická toxicita

Testy systémové toxicity odhadují potenciální škodlivé efekty lékařských pomůcek, biomateriálů a/nebo jejich extraktů po jednorázové nebo vícenásobné expozici během doby kratší než 24 h. Za akutní toxicitu jsou tedy považovány nepříznivé reakce, které se vyskytnou po podání jednotlivé nebo několikanásobné dávky zkušební vzorku během 24 h. V těchto

testech má rozhodující význam objem rozpouštědla ve vztahu k formě, ploše, hustotě a povrch materiálu. Musí být vybráno vhodné rozpouštědlo k extrakci maximálního možného množství vyluhovatelných látek. K testování slouží často myši, krysy, králíci a podle aplikace biomateriálu se využívá testů orálních, dermálních, inhalačních, intravenózních, intraperitoneálních a podkožních.

Subakutní toxicitou (toxicita opakované dávky) rozumíme výskyt nepříznivých reakcí po podání jednotlivé nebo několikanásobné dávky zkušební vzorku podávaného denně v období od 14 do 28 dní.

Subchronická toxicita je definována jako výskyt nepříznivých reakcí po podání jednotlivé nebo několikanásobné dávky zkušební vzorku podávaného denně do období střední délky života, obvykle 90 dní, ale nepřesahující 10% střední délku života zvířete.

Do kategorie testů systémové toxicity patří i test pyrogenicity (vyvolání horečky), kdy se zjišťují pyrogenní reakce z extraktů zprostředkované materiálem. Pozoruhodné je, že žádný jednotlivý test nedokáže rozpoznat pyrogenní reakci způsobenou materiálem, od reakce vyvolané kontaminací endotoxinem.

2.2.4.3 Genotoxicita

Testování genotoxicity probíhá jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Nejprve by se měly použít nejméně tři testy *in vitro*, z čehož dva by měly užívat savčí buňky. Ty by měly pokrýt pokrýt tři úrovně genotoxických efektů: vliv na DNA, genové mutace a chromosomální odchylky. K testování *in vivo* se přistupuje, pokud je indikováno z hlediska složení a/nebo chemického chování biomateriálu, nebo pokud výsledky *in vitro* testů signalizují potenciální genotoxicitu. Testování *in vivo* zahrnuje mikrojádrový test, cytogenetické testy na morku savčích kostí – chromosomální analýza, letální testy hlodavců, cytogenetická stanovení savčích embryonálních buněk, kapková zkouška a translokační dědičné analýzy u myší. Testy se provádějí s vhodnými extrakty, nebo rozpuštěným materiálem.

2.2.4.4 Implantace

Implantačním testem rozumíme stanovení lokálních patologických efektů živé tkáně na vzorek materiálu, nebo finální produkt, který je chirurgicky implantován na místo zamýšlené aplikace biomateriálu nebo lékařské pomůcky. Zhodnocení se provádí na makroskopické i mikroskopické (histologické) úrovni. Implantace dělíme na krátkodobé (do 12 týdnů) a dlouhodobé, které se využívají při implantaci do podkožní tkáně, svalů, kostí. Pro krátkodobé implantaci se využívají nejčastěji myši, krysy, morčata a králíci, kdežto k dlouhodobým testům je potřeba vybírat zvířecí druhy s předpokládanou relativně dlouhou dobou života, jako jsou krysy, morčata, králíci, psi, ovce, kozy, prasata apod. Pokud má být takto ohodnocena finální lékařská pomůcka, měly by být využívány větší zvířecí druhy. Např. náhrada srdečních chlopní je obvykle testována na ovci, kdežto úplná náhrada srdce u telat.

2.2.4.5 Hemokompatibilita

Hemokompatibilní testy hodnotí vliv kontaktu lékařské pomůcky nebo materiálu na krev a/nebo krevní komponenty. *In vivo* testy jsou navrhovány k simulaci geometrie, podmínek kontaktu a dynamice toku v klinické aplikaci materiálu. Dle ISO standardů existuje pět kategorií testů k určení hemokompatibility: trombóza, koagulace, krevní destičky, hematologie a imunologie. Při výběru testů hraje roli několik důležitých otázek. I přes to, že

in vivo testování u zvířat by bylo vyhovující, musí být zváženy rozdíly v krevní reaktivitě napříč živočišnými druhy, a tím může být predikce limitována v klinickém použití u člověka. Jelikož krevní hodnoty a reaktivita krve u člověka je velmi podobná primátům, je povoleno užití primátů k testování krevní kompatibility lékařských pomůcek. Testy na zvířatech jsou komplikovány také nedostatkem adekvátních materiálů, např. vhodných protilátek pro imunologické testy. Využití lidské krve naznačuje *in vitro* testování, což obvykle vyžaduje užití antikoagulantů, ale ty většinou nejsou přítomny v pomůcce v klinickém užití, možná kromě nejranějšího stádia implantace. I přes to, že hemokompatibilní stanovení komplikují druhové odlišnosti, k testování trombózy a tkáňových interakcí je využití zvířat považováno za vhodné.

2.2.4.6 Chronická toxicita

Testy chronické toxicity určují vlivy jednorázové, nebo několikanásobné expozice lékařské pomůcce, materiálu, a/nebo jejich extraktu během periody trvající nejméně 10 % střední délky života testovaného zvířete, např. 90 dní u krys. Toto testování by mělo být považováno za rozšíření testů subchronické (subakutní) toxicity.

2.2.4.7 Karcinogenita

Testy karcinogenity stanovují potenciál tvorby nádorů lékařské pomůcky, materiálu, a/nebo jejich extraktů, po jednorázové nebo několikanásobné expozici, nebo kontaktu, za čas střední délky života testovaných zvířat. Tyto testy by měly být prováděny pouze tehdy, pokud data z jiných zdrojů naznačují tendenci k indukci tumoru, a to (stejně jako testy chronické toxicity) v samostatných experimentálních studiích. Důležité a závazné je používání kontrolních srovnávacích materiálů, protože u zvířat se mohou tumory rozvinout i samovolně, a proto je statistické srovnání mezi testovaným biomateriálem/lékařskou pomůckou a kontrolním materiálem nezbytné. Obvykle se jako kontrolní materiál používají polyethylenové implantáty.

2.2.4.8 Reprodukční a vývojová toxicita

Tyto testy hodnotí potenciální vliv lékařské pomůcky, materiálu, a/nebo jejich extraktů na reprodukční funkce, embryonální vývoj (teratotoxicita) a prenatální a časný postnatální vývoj. Místo aplikace pomůcky musí být náležitě zváženo a testování a/nebo biologické zkoušky by měly být vedeny pouze tehdy, až když má pomůcka potenciální dopad na reprodukční schopnosti subjektu.

2.2.4.9 Biodegradace

Biodegradační testy stanovují vliv biodegradabilního materiálu a jeho biodegradačních produktů na tkáňovou odezvu. Zaměřují se na: stupeň degradace během daného časového úseku (kinetika biodegradace), povahu a původ degradačních produktů (např. nečistoty, aditiva, objemné polymery, atd.) a kvalitativní a kvantitativní stanovení produktů degradace a extrahovatelných látek v přilehlých tkáních a ve vzdálených orgánech. Mohou být připraveny a studovány testovací materiály srovnatelné s degradačními produkty ke stanovení biologické odezvy na produkty degradace očekávané u dlouhodobých implantátů. Příkladem takového přístupu je studium metalických a polymerních částic, které mohou být přítomny v dlouhodobých orthopedických protézách kloubů.

2.2.4.10 Imunitní odezva

Imunotoxicita je jakýkoliv nepříznivý vliv na funkci nebo strukturu imunitního systému, nebo jiných systémů v důsledku jeho dysfunkce. Nepříznivé, nebo imunotoxické efekty se vyskytnou, pokud humorální nebo buněčná imunita, která brání organismus proti infekci, neoplastické chorobě (imunosuprese), nebo zbytečnému poškození tkáně (chronický zánět, hypersensitivita, nebo autoimunita), je oslabená. Hodnocení imunitní odezvy není složkou standardní, běžně dostupnou pro *in vivo* testování tkáňové kompatibility. Příkladem nutného testování imunitní odezvy jsou přirozené, modifikované tkáňové implantáty, jako je kolagen, který je často využíván v různých typech implantátů.

2.3 Proteiny jako biomateriály [3]

Proteiny jsou v podstatě polymery aminokyselin poskládané do trojrozměrné struktury, které plní funkci hlavní strukturní složky mnoha tkání. Jsou důležité také z biochemického hlediska, jako substráty pro buněčnou adhezi a migraci, jako signální molekuly, enzymy, aktivní regulátory buněčné diferenciaci a funkcí a mnohé další. Protože struktura a vlastnosti přirozených tkání jsou tak silně závislé na proteinové složce, byly proteiny, a průmyslově vyráběné polymery obsahující aminokyseliny, vyvinuty jako biomateriály pro úpravu a náhradu tkání.

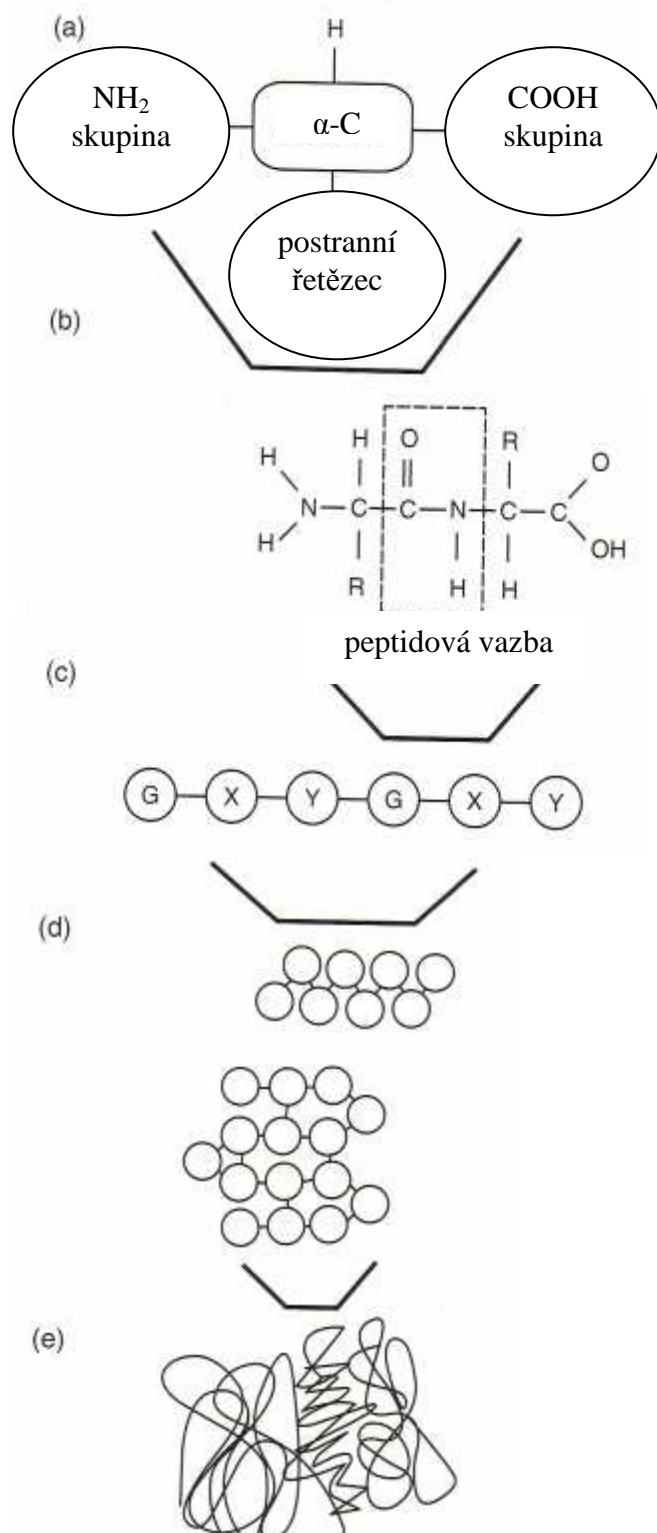
Jelikož aminokyseliny, tvořící proteiny, jsou produkovány v lidském těle, mohlo by se předpokládat, že biomateriály na proteinovém základě budou procházet přirozeně řízenou degradací [10] na produkty méně toxické, než degradační produkty některých syntetických polymerů, a že třeba i vyvolaná imunitní odezva bude slabší, než u některých syntetických polymerních biomateriálů, jako je třeba polymer kyseliny mléčné [11].

Chemické a mechanické vlastnosti proteinových biomateriálů mohou být přizpůsobeny specifickým typům aplikací fyzikální nebo chemickou modifikací.

2.3.1 Struktura a syntéza proteinů

Při syntéze proteinů v těle musí prekursorové molekuly projít čtyři úrovně, aby se staly funkčními proteiny. Obecnou strukturu aminokyseliny představuje centrální α -uhlíkový atom, obklopený vodíkovým atomem, karboxylovou skupinou, skupinou postranního řetězce a aminoskupinou (viz Obr. 1(a)). Jednotlivé aminokyseliny jsou spojeny peptidovými vazbami, což jsou rovinné, rigidní vazby spojující karboxylovou skupinu jedné aminokyseliny s aminoskupinou druhé (viz Obr. 1(b)). Tato lineární sekvence aminokyselin spojených peptidickou vazbou tvoří primární strukturu proteinu (viz Obr. 1(c)). Tvorbou vodíkových vazeb mezi aminokyselinami v primární struktuře dosáhne protein struktury sekundární, a jakmile se lineární struktury začnou ohýbat a tvořit komplikovanější struktury, typicky α -helixy nebo β -skládané listy, protein je v nejstabilnější formě sekundární struktury (viz Obr. 1(d)). Sekundární struktury se spojují dohromady a tvoří trojrozměrné terciální struktury, což jsou podjednotky, které mezi sebou mohou interagovat a tvořit tak proteinovou 3D kvartérní strukturu podjednotek (viz Obr. 1(e)).

Obr. 1: Struktura aminokyselin a základní úrovně syntézy proteinů [3]



2.3.2 Kolagen jako biomateriál

Široká škála buněk v lidském těle produkuje kolagen, snad nejvýznamněji fibroblasty. Kolagen se pro účely implantátů a tkáňového inženýrství nejčastěji získává z hovězí, koňské a prasečí tkáně, a může být zpracován do různých forem jako jsou filmy, smotky, vlákna a gely. Aby se zabránilo rychlé *in vivo* degradaci a zvýšila se mechanická síla kolagenu, musí být fyzikálně nebo chemicky fixován, popř. zesíťován. Mezi fyzikální metody patří zejména fotooxidace, termální dehydratace a UV záření. Častěji používané jsou metody chemické, i přesto, že fyzikální ošetření s sebou nenese riziko potenciálně toxických chemických residuí v kolagenu, ale zase inklinuje k slabému zesíťování [12]. Chemické síťování zahrnuje působení karboimidů, glutaraldehydů a polyglycidyl etheru.

Zesíťování, a tudíž i mechanické vlastnosti různých typů kolagenů, může ovlivňovat i aminokyselinové složení. K tvorbě přirozených intra- a inter-molekulárních vazeb kolagenu je nezbytný lysin a hydroxylysin [13]. Čím větší je obsah těchto dvou aminokyselin v kolagenu, tím je resistantnější k enzymatické i termální degradaci. Lysin bývá také přidáván k chemickým fixačním prostředkům ke zvýšení jejich účinnosti [13].

Kolagen má jako biomateriál široké uplatnění od regenerace krevních cév, srdečních chlopní, šlach, vaziva, kůže, periferního nervového systému, chrupavek, menisků, až po plastickou chirurgii a podávání léčiv [14].

2.3.2.1 Mechanické vlastnosti

Některé základní mechanické vlastnosti kolagenu (a vztahy struktura-vlastnosti) jsou již zcela prozkoumány. Jelikož kolagen lze najít v každé tkáni (je nejčastějším strukturálním proteinem v těle), je jeho volba jako biomateriálu pro mnoho typů tkání a implantátů zcela logická.

Teplota a pH jsou známé parametry, které ovlivňují proteinovou stabilitu a tyto proměnné bývají často přizpůsobovány v závislosti na „trávení“ přírodního materiálu. Rozsah teplot od 0 do 37 °C relativně neovlivňuje materiálové chování kolagenu [15], při/nad 37 °C struktura triplhelixu denaturuje [14][16]. Stejného efektu bylo dosaženo při vystavení kolagenu nízkému pH rozpouštědla.

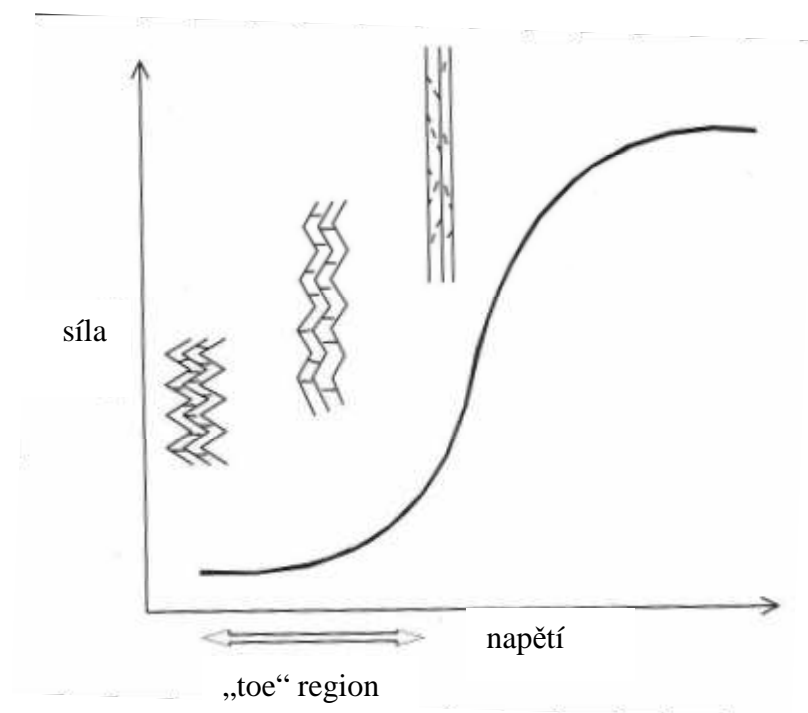
Při mechanickém testování vykazují kolagenová vlákna a jemné kolagenní tkáně charakteristický tvar (nelineární závislost) síly napětí (tzv. stress-strain křivka – viz Obr. 2). Nonlinearita křivky je způsobená přirozeným „zvlněním“ molekuly kolagenu v relaxovaném stavu. Při lehkém napětí se zvlnění rozpíná a molekula kolagenu se stává lineárnější, pokud napínací síla dále roste, jsou namáhány příčné vazby v molekule. Během každodenních aktivit kolagen v tkáních zpravidla pracuje v nižší oblasti napětíové křivky, známé jako „toe region“, za ním již křivka dosahuje obvykle lineární části, která demonstruje chování lineárního elastického materiálu.

2.3.2.2 Fyziologická odezva

Jednou z obrovských výhod přirozených biomateriálů je jejich testování přímo v lidském těle. Kolagenázy a metaloproteinázy jsou v tkáních produkovány buňkami degradujícími kolagen. Produktem degradace bývají aminokyseliny, se kterými si tělo dokáže poradit v běžných metabolických procesech.

Struktura trojité šroubovice kolagenu je evolučně zakonzervována, což znamená, že tato struktura je přítomna napříč živočišnými druhy. Zejména to platí u kolagenu typu I, který bývá nejlépe tolerován a vyvolává nižší imunitní odezvu než jiné typy [14]. U živočišných druhů se liší složení koncového regionu molekuly kolagenu. Pro užití kolagenu jako biomateriálu se často tato koncová část molekuly odstraňuje, nebo chemicky modifikuje, a tím se redukuje imunitní odezva na materiál. Antigenní struktury může ale molekula kolagenu obsahovat i ve své středové části [17]. Asi 2,5 – 4 % populace má alergii na hovězí kolagen [18][19][20].

Obr. 2: Charakteristická křivka „stress-strain“ kolagenu [3]



2.3.3 Další používané proteiny a polymery aminokyselin

Elastin je přirozený, lineárně nejelastičtější proteinový materiál. Jde o nerozpustný polymer složený z několika molekul tropoelastinu vzájemně kovalentně vázaných. Denaturuje okolo 66 °C. Lidský elastin se nachází nejvíce ve stěnách krevních cév, vazivu a v plicní tkáni. Purifikace elastinu je obtížná (lebky kopytnatců, pavouci, koryši, hmyz), proto tento protein není široce využíván jako biomateriál.

Hedvábí je velmi stabilní protein s vysokou hustotou vodíkových vazeb, přirozeně ho produkují pavouci a housenky bource morušového. Pro aplikace a výzkum biomateriálu se využívají vlákna hedvábí housenek, protože pavouci produkují mnohem pomaleji a nelze je snadno domestikovat. Bourec morušový je plně domestikován, jeden kokon larvy *Bombyx mori* může vynést 300 až 1200 m využitelného hedvábného vlákna [21]. Vlákna hedvábí bource morušového se skládají ze dvou nebo více středových vláken – fibroin, držících pohromadě díky sercinu – protein podobný lepidlu [22], ten musí být pro aplikaci hedvábí jako biomateriálu odstraněn, protože vyvolává závažné alergické reakce.

Fibrin je přirozeně vyskytující se protein v kaskádě krevního srážení, díky jeho roli „lepidla“ v koagulačním systému, kdy drží krevní sraženiny pohromadě, je nejvíce využíván jako biomateriál na těsnící hmoty a lepidla. Fibrinová lepidla se používají na zcelení

a uzdravení ran po chirurgických zákrocích, k přilnutí kožních transplantátů, k podpoře opravy nervové tkáně atd. Polymerním prekurzorem fibrinu je dimer fibrinogen.

Extracelulární matrix (ECM) – ECM scaffoldy mohou být z několika různých zdrojů, např. tenké střevo, močový měchýř prasat, hovězí perikard, psí žaludek, kůže, Achillovy šlachy. Ve všech případech jsou tkáně promyty detergentem k odstranění buněk a zůstávají pouze strukturální a funkční proteiny extracelulárního matrixu. Vlastnosti ECM materiálů se výrazně liší dle zdroje, a to jak živočišného druhu (prasečí, hovězí, psí atd.), tak i druhem tkáně (močový měchýř, žaludek, střevo atd). Po přečištění ECM materiálů v nich stále může zůstat malý počet xenogenních buněk, proto tyto biomateriály zpravidla vyvolávají alespoň mírnou imunitní odezvu.

Syntetické polymery aminokyselin nejsou v současné době běžně používány jako biomateriály, ale jde o oblast intenzivního výzkumu. Příkladem je vývoj tyrosinových polykarbonátů, které mají relativně dlouhý degradační čas (mnohem delší než polymer kyseliny mléčné) [23], a tak jsou ideálními kandidáty na biomateriály pro prodloužené uvolňování léčiv, nebo orthopedické implantáty. Stále se ale zkoumají aspekty biokompatibility těchto syntetických polymerů.

Tabulka 6: Některé vybrané vlastnosti diskutovaných proteinů [3]

Protein	Funkce	Velikost	Termální stabilita
kolagen	ECM protein	285 kDa	denaturuje při 39 °C [24]
fibrinogen	krevní srážení	340 kDa	denaturuje při 56 °C [25]
elastin	ECM protein	–	denaturuje při 66 °C [26]
hedvábí (<i>B. bomby</i>)	reprodukční	variabilní	denaturuje při 210 °C [21]

2.4 Další používané biomateriály

Stručný přehled dalších používaných biomateriálů, které již nejsou předmětem předložené diplomové práce uvádí *Tabulka 7*.

Tabulka 7: Přehled jiných používaných biomateriálů [3]

Poly(α -estery) – kyselina polyglykolová, polylaktidy, poly(<i>p</i> -dioxanon)
polyuretany
polymery odvozené od <i>L</i> -tyrosinu
poly(propylen fumarát)
hyaluronan (kyselina hyaluronová)
chitosan
alginát
polyfofazený (anorg. polymery)
metalické biomateriály – nerez. ocel, kobalt, titan
keramické biomateriály

2.5 Izolace kolagenu z živočišných tkání

Popisovány jsou izolace především z kůží, kostí zvířat, z rybích šupin, i ze skeletů mořských medúz [27][28][29][30]. Obecnou snahou je využívat odpadní materiály z různých průmyslových zdrojů. Často jsou přípravy kolagenu prováděny za snížené teploty (4 °C)

a dvěma postupy (s přídavkem nebo bez přídavku enzymu) k izolaci kolagenu rozpustného v kyselině, nebo kolagenu rozpustného v roztoku pepsinu.

Obecný postup izolace zahrnuje několik kroků, přičemž prvním z nich je odstranění jiných proteinů (než kolagen) mícháním kůží v roztoku NaOH, následuje promytí destilovanou vodou k dosažení neutrálního pH, a poté odstranění lipidické složky materiálu pomocí detergentu [27]. Je publikován i postup odstranění lipidů diethyl etherem [28]. Někteří autoři tento krok nepopisují vůbec, např. při izolaci kolagenu z kostí [29]. Následuje extrakce materiálu v 0,5 M kyselině octové po dobu 3 dnů (s případným přídavkem pepsinu), filtrace (popř. centrifugace) a vysolení z roztoku pomocí NaCl do finální koncentrace 0,9 – 2,6 M, řada autorů uvádí ještě přítomnost tris(hydroxymethyl)aminomethanu [27][28]. Sediment se centrifuguje za vysokých otáček (10 000, 20 000g), je možné jej rozpustit a proces vysolování a solubilizace opakovat [29]. K přečištění rozpuštěného preparátu se využívá dialýza proti kyselině octové nebo destilované vodě [27][28][29]. Jako finální krok v řadě případů bývá používána lyofilizace materiálu [27][28].

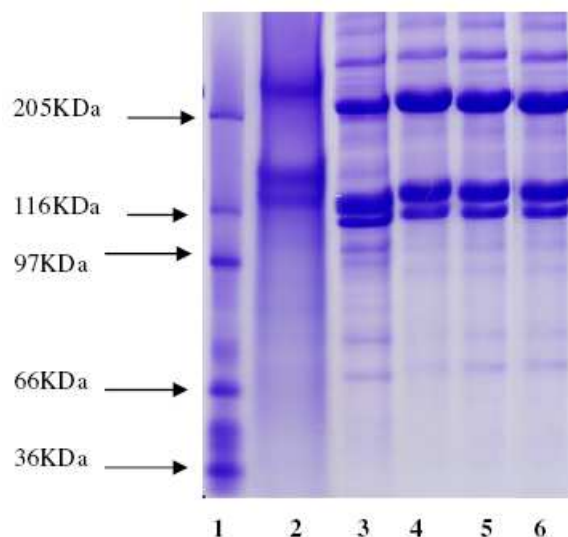
Příkladem snahy o využití odpadního živočišného materiálu je například izolace kolagenu z kostí aligátorů žijících v jižních státech, jako je Texas, Florida, kde tito aligátoři žijí nejen ve volné přírodě, ale i na aligátorech farmách. Tyto farmy lze najít i v Číně a Thajsku, kde je populární jiný druh aligátora. Aligátorejší maso se hojně využívá v potravinářství, zatímco kosti jsou odpadem a zpracovatelé i státní orgány volají po efektivnějším využití odpadních produktů. Autoři zjistili, že vyizolovaný kolagen má nejméně dva různé α -řetězce a řetězce vzniklé jejich zesítním, z čehož lze usuzovat na převažující kolagen typu I. Denaturační teplota byla stanovena na 38 °C, vysoká termální stabilita naznačuje potenciální využití kolagenu z kostí aligátorů jako náhrada za hovězí kolagen [29].

Dalším příkladem je izolace kolagenu ze sladkovodních ryb (kůže, šupiny, kosti), především čtyř druhů kaprů chovaných v Číně, která je největším světovým producentem sladkovodních ryb. Po výlovu, pokud se nestihne zpracovat, či prodat, musí být část ryb vyražena, což způsobuje znečišťování a hlavně zápach v okolí. Na druhé straně jde i o výrazný ušlý zisk producentů, proto je výroba nějakého produktu s přidanou hodnotou velmi slibným faktorem k dalšímu urychlení rozvoje tohoto chovného průmyslu. Hlavním zdrojem průmyslového kolagenu jsou prasata a hovězí dobytek, který v poslední době vyvolával obavy z důvodu nemoci šílených krav (BSE). Kolagen z vepřových matic zase není přípustné užívat v některých oblastech z náboženských důvodů, proto se hledají stále nové zdroje kolagenu [27]. Existuje mnoho prací o využívání různých mořských živočichů k produkci kolagenu [31][32][33][34][35], ale jen několik málo o sladkovodních živočiších [36][37]. Kolagen izolovaný z kůže, šupin i kostí kapra byl složen opět nejméně ze dvou α -řetězců s molekulovou hmotností cca 116 – 130 kDa a jde o kolagen typu I. Na gelu jsou viditelné i fragmenty okolo cca 210 kDa a 300 kDa, které by mohly odpovídat β -řetězcům a celé molekule kolagenu (viz *Obr. 3*). Molekulová hmotnost podjednotek rybího kolagenu je nižší než kolagenu z telecí kůže. Obecně odchylka v molekulové hmotnosti je dána různými zdroji kolagenu (savčí versus rybí). Zdá se také, že existuje vztah mezi molekulovou hmotností kolagenu a jeho termální stabilitou. Kolagen s vyšší molekulovou hmotností pravděpodobně má i vyšší termální stabilitu. Zatím však o této skutečnosti není žádný záznam a je třeba další výzkum k potvrzení hypotézy. Denaturační teplota kapřího kolagenu byla stanovena okolo 28 °C, obecně denaturační teplota kolagenů z ryb chladných vod je nižší než u ryb z teplých vod. Lze předpokládat, že kolagen z kapra má tedy vyšší termální stabilitu než

kolageny z mnoha mořských druhů ryb [27]. Zároveň je ovšem denaturační teplota kapřího kolagenu nižší než kolagenu z telecí kůže (40,8 °C) [38].

Z předchozích příkladů je zřejmá snaha o izolaci kolagenu z alternativních zdrojů, dle místních zvyklostí chovu různých živočišných druhů. V našich středoevropských podmínkách je aktuální zejména chov drůbeže, o které lze uvažovat z hlediska snahy o nahrazení hovězího kolagenu.

Obr. 3: Ukázka gelové elektroforézy PAGE-SDS kolagenu z kůže (4), šupin (5) a kostí (6) kapra a srovnání se standardem kolagenu z telecí kůže (2), s kolagenem z kůže tresky (3) a vysokomolekulárním bílkovinným standardem (1) – 7,5% gel [27]



2.6 Metody analýzy proteinů

2.6.1 Stanovení koncentrace proteinů

Pro kvantifikaci celkových proteinů existuje celá řada metod. Základním problémem je výběr nejvhodnější metody z hlediska její citlivosti, množství použitého vzorku a interferujících látek.

Vhodnou strategií je kombinovat dvě metody založené na různých chemických principech, jako např. měření absorbance při 280 nm a tvorbu měďnatých komplexů. Metody stanovení celkových proteinů můžeme rozdělit do pěti skupin:

- 1) Metody založené na interakci proteinů s ionty mědi
 - Biuretová metoda,
 - Hartree – Lowryho metoda,
 - Bicinchoninová metoda.
- 2) Ninhydrinová metoda po kyselé hydrolyze proteinů.
- 3) Stanovení z UV spektra.
- 4) Metoda Bradfordové s vazbou barviva Coomassie modř na proteiny.
- 5) Stanovení celkových proteinů ze sušiny [39].

2.6.1.1 Biuretová metoda

Metoda je založená na chelataci měďnatého iontu amidovými strukturami polypeptidu ionizovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku červeně zbarveného komplexu. Je pojmenována podle sloučeniny biuretu, vznikajícího tavením močoviny za odštěpení amoniaku, která je modelem dvou peptidových vazeb a vytváří za těchto podmínek barevný komplex s mědí. Metoda je vhodná pro vzorky obsahující 1 – 10 mg proteinu na ml, které se zředí zhruba 5x přidáním činidla na konečnou koncentraci 0,2 – 2 mg/ml. Většina proteinů poskytuje tmavě červené zbarvení s maximem absorpce při 550 nm [39].

2.6.1.2 Hartree – Lowryho metoda

Původní Lowryho metoda je z roku 1951, Hartree vypracoval její modifikaci v roce 1972. Toto stanovení je kolorimetrické, založené na dvousložkovém činidle. První složkou je činidlo biuretové, druhou složkou je Folin-Ciocalteu činidlo na fenoly. Jsou to polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů a barví se modře. Absorbance se měří při 650 nm [39].

Tabulka 8: Souhrn stanovení celkových proteinů [39]

Stanovení	Vzorek	Detekční limit (g/l)
Biuretová metoda	1 ml	1 – 10
Hartree – Lowry metoda	1 ml	0,1 – 0,6
Bicinchoninová kys. metoda	100 µl	0,2 – 1,0
Ninhydrin po hydrolýze	1 ml	0,02 – 0,05
UV absorpce	1 ml	0,03 – 0,3
Bradfordová metoda	100 – 200 µl	0,06 – 0,3
Sušina	0,5 – 10 ml	2 – 10

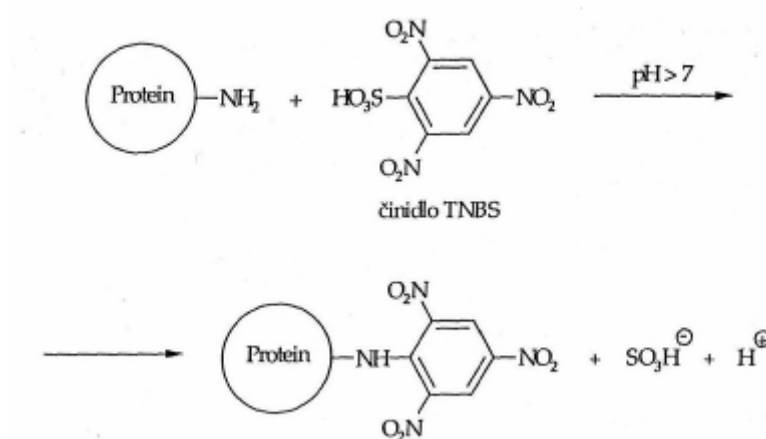
2.6.2 Metoda TNBSA

Kromě zmiňovaných metod ke stanovení celkových proteinů se využívají ještě chemické modifikace proteinů (resp. příslušného aminokyselinového zbytku) různými činidly, což přináší velmi cenné poznatky o vztahu struktury a funkce proteinů, jmenovitě jde např. o řešení otázek jako:

- stanovení počtu některých aminokyselin v polypeptidových řetězcích a jejich sterické dostupnosti
- změna fyzikálně-chemických vlastností proteinů (např. náboje)
- stabilizace proteinů a jejich vazebných míst a aktivních míst
- sekvenční analýza proteinů a peptidů a jejich chemická syntéza aj.

K těmto metodám patří stanovení obsahu primárních aminoskupin činidlem TNBSA (kyselina trinitro-benzensulfonová). Její reakce s primárními aminoskupinami je silně závislá na pH, protože reaguje pouze s neprotonovanou aminoskupinou, navíc se TNBSA v neutrální oblasti pH váže i na –SH skupiny. Vzniklý reakční produkt je však labilní v alkalickém prostředí. Absorbance se měří při 345 nm [40].

Obr. 4: Schéma vazby činidla TNBSA na protein [40]



2.6.3 Elektromigrační (elektroforetické) metody

Elektroforetickými metodami nazýváme soubor technik, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Elektroforéza jako separační technika byla poprvé použita Tiseliiem, který pomocí volné elektroforézy v roce 1937 rozdělil směs bílkovin. Později za tento objev obdržel Nobelovu cenu.

Jestliže jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě. Rychlost, kterou se ion v elektrickém poli pohybuje, může být vyjádřena vztahem:

$$v = \mu \cdot E$$

v...rychlost iontu

μ ...elektroforetická pohyblivost

E...intenzita elektrického pole

Částice jsou při průchodu okolním médiem vystaveny odporu sil vnitřního tření. Jejich mobilita je tedy výsledkem rovnováhy mezi silou působící na ionty v elektrickém poli a silou vnitřního tření.

$$\mu = \text{síla elektrického pole } F_E / \text{síla vnitřního tření } F_F$$

$$F_E = q \cdot E$$

$$F_F = -6\pi\eta rv$$

q...náboj iontu

η ...viskozita roztoku

r...poloměr iontu

v...rychlost iontu

Z předchozích vztahů vyplývá, že síla vnitřního tření se mění s viskozitou prostředí. Proto se změnou teploty dojde ke změně této síly a tudíž ke změně rychlosti pohybu částic. V průběhu elektroforézy dojde k ustavení rovnováhy, která je definována rovnováhou mezi silou elektrického pole a silou vnitřního tření. Při rovnováze budou mít obě síly stejnou hodnotu, ale opačného směru. Mobilitu je pak možné pomocí fyzikálních parametrů vyjádřit následovně:

$$\mu = q / 6\pi\eta r$$

Z uvedených rovnic je zřejmé, že malé částice s velkým nábojem mají velkou mobilitu (pohyblivost), zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Efektivní mobilita, tj. mobilita, kterou skutečně při elektroforéze naměříme, bývá obvykle nižší než teoretická elektroforetická mobilita a je závislá na pH a použitém pufru. Úspěch separace látek ze směsi lze předpokládat jen tehdy, budou-li mít separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti.

Snaha po dosažení co nejlepší separace vedla k vypracování značného množství různých technik a jejich modifikací, které lze shrnout do čtyř základních skupin:

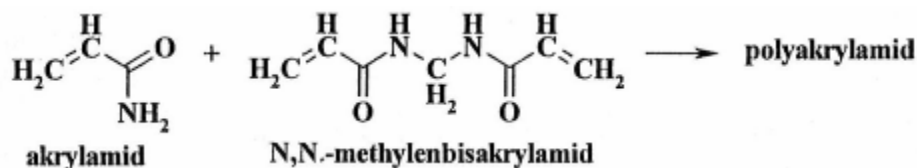
- volná elektroforéza neboli elektroforéza s pohyblivým rozhraním
- zónová elektroforéza neboli elektroforéza na nosičích
- rovnovážná elektroforéza reprezentovaná izoelektrickou fokusací
- kapilární elektroforéza [41].

Elektroforéza se velmi často používá pro analytické dělení biologických látek. Gelová elektroforéza patří mezi nepraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Používané nosiče by měly být stabilní a inertní, musí být vodivé a jejich struktura nesmí bránit putování iontů ve vodném prostředí. U běžně používaných gelů, jako je agarosa nebo polyakrylamid, je možné ovlivnit velikost jejich pórů [39].

2.6.3.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE), popř. s přidavkem SDS (PAGE-SDS)

Polyakrylamidový gel je inertní, průhledný, mechanicky pevný a skýtá možnost přípravy nosiče různých předem zadaných vlastností (např. hustota zesíťování a gradient hustoty gelu). Vzniká polymerací základního monomeru – akrylamidu (AA) a zesíťovacího činidla N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu iniciačního činidla – persíranu amonného (APS). BIS se náhodně, s frekvencí danou jeho podílem ve směsi, zabudovává do lineárního řetězce polymeru a může spojit dva lineární řetězce polyakrylamidu kovalentní vazbou. Tato reakce musí být katalyzována, proto se do směsi vždy přidává stabilizátor volných radikálů – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED). Kyslík je inhibitorem polymerace, proto je vhodné polymerační směs před přidavkem iniciátoru a katalyzátoru zbavit kyslíku, např. krátkodobou sonifikací.

Obr. 5: Polymerační reakce akrylamidu [39]

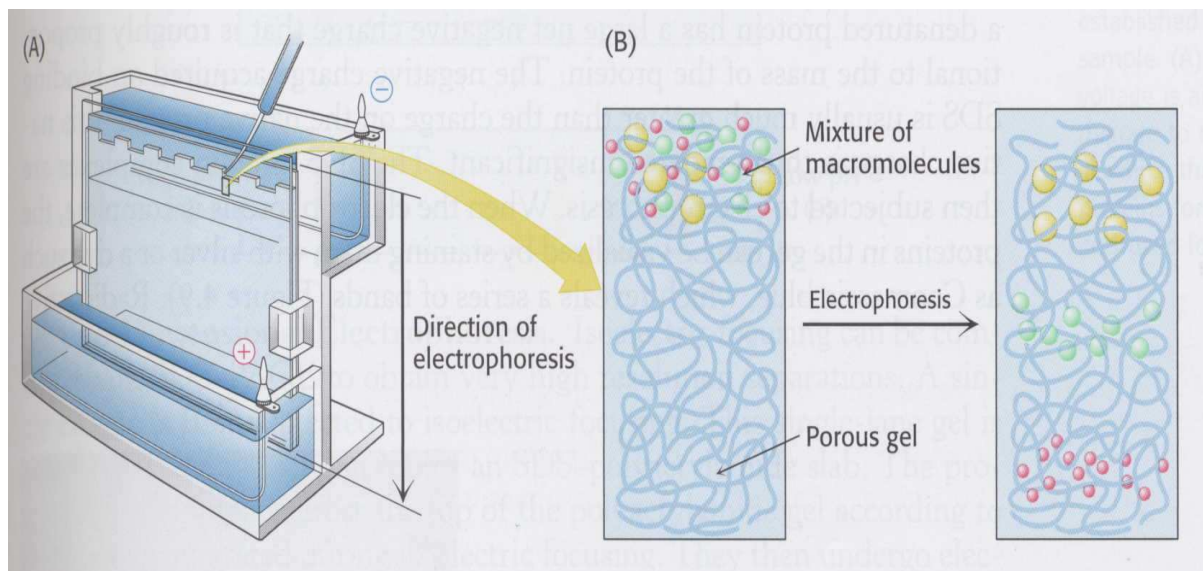


Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány podílem akrylamidu v gelu a stupněm zesíťování (poměr AA/BIS). Nejčastější celkové koncentrace akrylamidu jsou 3 – 15%, přičemž koncentrace BIS obvykle odpovídá 5 % celkového množství akrylamidu. Volba vhodné koncentrace AA a BIS je klíčovou podmínkou k dosažení dobré separační účinnosti gelu. Poměr AA/BIS se může pohybovat v rozmezí 100:1 až 20:1 (zpravidla 40:1).

Původně se PAGE prováděla v krátkých skleněných trubičkách, dnes se prakticky výhradně používají plošné gely, které polymerují v pufru mezi dvěma skleněnými plotnami ve vhodné aparatuře. Vzorky se nanášejí do jamek vytvořených pomocí formy tvaru hřebene vložené do gelu na začátku polymerace. Na jednom gelu lze paralelně analyzovat více vzorků. Plošná

elektroforéza se provádí buď horizontálně, kdy je gelová deska umístěna v přístroji ve vodorovné poloze, nebo vertikálně, kdy deska je umístěna kolmo na podložku. Oba tyto způsoby mají své speciální použití.

Obr. 6: Schéma průběhu vertikální gelové elektroforézy [40]



Obr. 7: Aparatura pro provedení vertikální elektroforézy PAGE-SDS



Vodivé prostředí mezi elektrodami je zajištěno tlumivým roztokem. Po vložení napětí na gel se mezi elektrodami vytvoří elektrické pole, jehož intenzita je podílem napětí a celkové délky gelu. Jelikož gel byl vytvořen v prostředí pufru, tj. elektrolytu a molekuly biopolymerů rovněž nesou náboj a jsou schopny vést elektrický proud, obvodem bude protékat proud.

Molekuly bílkovin nesou množství kladných i záporných nábojů, jejichž počet i celkový součet závisí na pH prostředí, v němž se nacházejí. Proto volba pH pufru, v němž gel polymeruje, je důležitá pro celkový výsledek dělení. Cílem je zvolit takové pH, které zajistí největší rozdíly ve specifickém náboji dělených složek bílkovinné směsi. Pro kyselé bílkoviny je optimální mírně alkalické nebo neutrální pH (pohyb molekul k anodě), pro bazické

bílkoviny je to pH mírně kyselé (migrace ke katodě). Kapacita (tedy i koncentrace) pufru musí být velká, aby bylo udrženo konstantní pH i v zónách jednotlivých frakcí separovaných bílkovin (0,1 – 0,2 M i vyšší).

Zásadní dělení technik elektroforézy je podle toho, zda je v kontinuálním nebo diskontinuálním systému. Diskontinuita může být jak v koncentracích gelu, tak především v pH a iontové síle.

Jednou z nejpoužívanějších modifikací PAGE je elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného – SDS (PAGE-SDS). Metoda je založená na schopnosti bílkovin vázat SDS v množství asi 1,4 mg na 1 mg proteinu hydrofobní interakcí. Tato vlastnost bílkovin se zdá být univerzální a pravděpodobně souvisí se samotnou podstatou jejich terciární struktury. SDS musí být přítomen ve vzorku i v gelu. SDS uděluje proteinům uniformní záporný náboj, a tvar tyčinky o konstantním průměru a délce úměrné relativní molekulové hmotnosti, a ty se pak všechny pohybují k anodě, přičemž pohyblivost je dána velikostí molekuly. Aby tyto komplexy mohly vzniknout, je nutné rozštěpit disulfidové můstky mezi řetězci bílkovin, nebo uvnitř těchto řetězců, pomocí látek redukujících tyto vazby (např. merkaptoethanol). Některé bílkoviny je nutné ještě zahřát na 60 či 100 °C na několik minut, proto se tento krok standardně provádí ve všech případech. Později bylo zjištěno, že pohyblivost bílkovin v gelu v přítomnosti SDS je nepřímě úměrná logaritmu molekulové hmotnosti. To znamená, že na základě měření nejméně tří molekul se známou molekulovou hmotností v SDS-PAGE lze gel „nakalibrovat“ a metodu použít ke stanovení relativní molekulové hmotnosti neznámé bílkoviny (závislost relativní vzdálenosti R_f na logaritmu relativní molekulové hmotnosti ($\log M_r$) standardů). Pohyb čela se indikuje přidáním nízkomolekulárního barviva (bromfenolová modř) ke vzorku, které vytváří ostrý barevný pruh putující s čelem. Je třeba doplnit, že povrchový náboj bílkovin v přítomnosti SDS vede k rozrušení jejich kvartérní struktury, lze tedy pozorovat pouze podjednotky složených bílkovin a nevýhodou metody může být to, že nepodává informace o nativním stavu bílkoviny.

V současnosti pravděpodobně nejpoužívanějším technickým provedením PAGE je diskontinuální (disková) elektroforéza. Její název je odvozen od toho, že vzorek putuje během separace přes dva gely s různou porositou a s různými elektrolyty. Nejpoužívanější je modifikace dle Laemmliho prováděná v přítomnosti SDS. Úkolem prvního gelu (koncentrující; stacking gel) je zakoncentrování (fokusace) vzorku do úzké zóny. Takto koncentrovaný vzorek vstupuje do dělicího gelu, jehož separační účinnost je pak vysoká bez ohledu na původní objem vzorku. Rozdílné funkce obou gelů lze dosáhnout vhodnou volbou pH a složení pufru a porosity gelu.

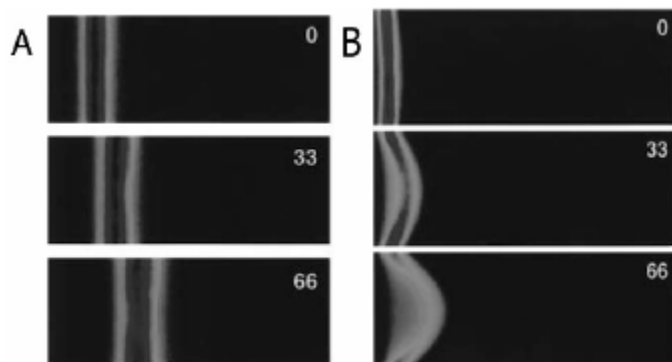
Po skončení elektroforézy je nutné rozdělené bílkoviny detekovat (vizualizovat). Toho lze dosáhnout s pomocí barviv, která se s vysokou afinitou vážou na molekuly bílkovin, jako je Amidočern 10B, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ponceau S. Impregnace gelu roztokem barviva, a posléze vymytí nespecificky vázaného přebytečného barviva (odbarvení), umožní pozorovat jednotlivé zóny bílkovin jako modré pásy na slabě modrém pozadí. Pomocí 1-anilin-8-naftalensulfonátu lze vizualizovat bílkoviny s použitím fluorimetrické detekce. Po ozáření zdrojem UV záření lze detekovat zóny bílkovin jako zeleně fluoreskující pruhy na nefluoreskujícím pozadí. Velmi citlivou metodou je detekce bílkovin stříbrem, při níž se z amoniakálního stříbrného komplexu adsorbovaného na povrchu molekul bílkovin chemicky redukuje kovové stříbro [41][42].

2.6.3.2 Mikrofluidní elektroforetické techniky

K zavedení elektroforetických technik na mikročipech vedl stále narůstající zájem o minimalizaci procesů v posledních letech. Mikrofluidní zařízení slouží na manipulaci s nepatrnými množstvími tekutin, nejpoužívanější je pro analýzu biomakromolekul, a to především nukleových kyselin, bílkovin a sacharidů [41].

Uplatňuje se zde, podobně jako v kapilární elektroforéze, princip elektroosmotického toku. Jedná se o pohyb vzorku způsobený pohybem iontů blízko povrchu stěn pod vlivem aplikovaného elektrického pole v kapiláře nebo kanálku. Protože pohyb vzorku probíhá blízko u povrchu, výsledný tok má plochý rychlostní profil, což je příčinou minimální disperze vzorku (viz Obr. 8) [43].

Obr. 8: Vizualizace tokových profilů: A) elektroosmotický tok, B) tlakem hnáný tok [43]



Nejběžnější metoda s použitím čipu je kapilární elektroforéza, pak také izoelektrická fokusace a gelová elektroforéza. Aplikace elektroforézy zahrnuje jak použití polyakrylamidových gelů, tak agarosy, nebo i dalších materiálů s vlastnostmi molekulového síta. Mezi nejspolehlivější metody detekce patří optické metody, které jsou i nejpoužívanější, dále metody elektrochemické a v neposlední řadě detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Z optických metod je nejběžnější fluorescence. Malé rozměry mikrokanálku a malé objemy dávkovaného vzorku vyžadují použití citlivého detektoru, proto se nejčastěji využívá laserem indukovaná fluorescence, kdy jsou proteiny označené sloučeninami jako fluorescein izothiokyanát nebo tetramethylrhodamin izothiokyanát, které reagují s aminoskupinami proteinů [43].

2.6.4 Gelová chromatografie (gelová permeační chromatografie, gelová filtrace)

Gelová chromatografie je jednou z nejdůležitějších metod v preparativní i analytické chemii biopolymerů. Termínem gelová filtrace se označuje většinou oddělování látek s velkým rozdílem v molekulové hmotnosti (např. odsolování bílkovin), zatímco název gelová permeační chromatografie se užívá nejčastěji při separaci látek s blízkými molekulovými hmotnostmi. Z teoretického hlediska je nejvhodnější termín kapalinová vylučovací chromatografie, jedná se totiž o rozdělovací chromatografii, kdy se látky dělí mezi mobilní kapalnou fázi a stacionární kapalnou fázi stejného složení, která je obsažena v pórech gelových částic a je omezeně přístupná. Princip metody spočívá v separaci látek na základě rozměrů molekul. Na pórovitém gelu (molekulovém síti) dochází k tzv. sférickému vyloučení

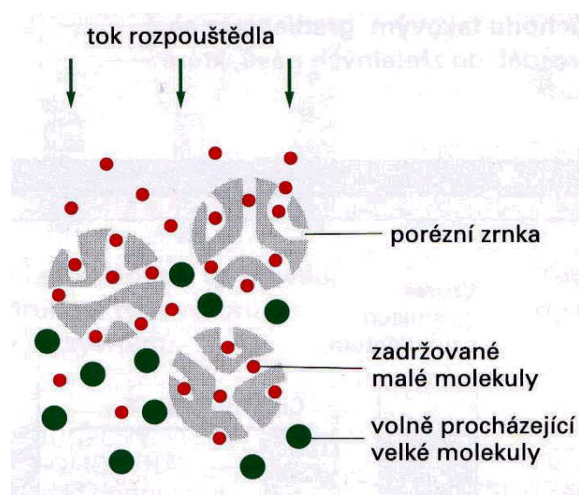
větších molekul (podle rozměrů pórů gelu), naopak malé molekuly pronikají do nitra částic gelu (viz

Obr. 9). Z toho vyplývá, že velké molekuly procházejí sloupcem rychleji a látky o menších molekulových hmotnostech se eluují později v pořadí dle zmenšujících se relativních hmotností. Látky o nižších molekulových hmotnostech než je velikost nejmenších pórů se od sebe neoddělí. Molekulová síta lze využít při zakoncentrování vzorků biopolymerů, odsolování roztoků, purifikaci a určení relativních molekulových hmotností biopolymerů [39].

Tabulka 9: Přehled používaných materiálů pro gelovou chromatografii [39]

Materiál	Popis
Sephadexy	fragmenty dextranu zesíťované pomocí epichlorhydrinu, vhodné na odsolování i separaci bílkovin (dle velikosti částic)
Sepharosy	na bázi agarózy (nerozvětvený polysacharid, součást agaru), jednotlivé řetězce polymeru vázány pouze slabými silami (ne kovalentně), mají velké póry, hodí se pro separaci bílkovin s relativní molekulovou hmotností nad 200 000
Bio-gely P	připravují se polymerací akrylamidu a methylenbisakrylamidu, vyšší rozsah frakcionace, lepší průtok oproti sephadexům, ale nižší rozlišovací schopnost
Styragel	na bázi styrenu
Merckogel OR-PVA	na bázi vinylacetátu
Spheron P, Separon	na bázi glykolmethakrylátu
Bio-Glass	skleněné porézní náplně
Porasil, Spherosil	porézní silikagel

Obr. 9: Princip gelové chromatografie [50]



2.6.5 Další metody používané k charakterizaci kolagenu

Obecně se nejčastěji využívá elektroforetické stanovení molekulové hmotnosti podjednotek kolagenu metodou PAGE-SDS [27][44], popřípadě i přibližné srovnávací kvantifikace

s využitím příslušného softwaru k vizualizaci intenzity jednotlivých bandů na gelu [29][34][45].

Často bývá také analyzováno aminokyselinové složení kolagenových vzorků, a to hydrolýzou 6 M HCl při 110 °C bez přístupu O₂ po dobu 22 – 24 hodin, s následnou analýzou hydrolyzátů na automatickém analyzátoru aminokyselin [27][29][30][34][44][45].

Ke stanovení termální stability a denaturační teploty bílkoviny se užívá viskozimetrického měření v rozsahu daných teplot, které se mění konstantní rychlostí [27][29][34][44][45].

Metoda peptidového mapování využívá štěpení proteinu pomocí enzymu (proteináza K), a následná vizualizace jednotlivých peptidů je provedena elektroforeticky na gelu (PAGE-SDS) [27].

Využít lze i spektrometrii, proměřováním UV-VIS spekter při různých vlnových délkách (200 – 460 nm) je možné vidět slabou absorbanci známých chromoforů tyrosinu a fenylalaninu, protože patří, co do kvantity, mezi méně se vyskytující aminokyseliny v kolagenech. Tryptofan se zde nevyskytuje vůbec [27][44]. Pozitivní pík okolo 223 nm a negativní pík okolo 204 nm jsou charakteristické znaky pro trojitou helikální strukturu kolagenu [46]. K lepšímu odhadu sekundární struktury kolagenu lze využít spektra cirkulárního dichroismu (CD spektra) [29][34][45], nebo, pomocí identifikace –NH funkčních skupin, infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) [27][44].

CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je studium a biochemická charakterizace biomateriálů na bázi kolagenu. V rámci práce budou řešeny následující dílčí úlohy:

- optimalizace postupu izolace a purifikace kolagenu z několika druhů živočišných tkání (kuřecí, krůtí, rybí, vepřové)
- optimalizace analýzy modifikovaných biomateriálů s kolagenem pomocí vertikální elektroforézy PAGE-SDS a mikrofluidního elektroforetického systému
- testování metod ke sledování tepelné a fyziologické stability kolagenových preparátů
- porovnání získaných parametrů kolagenových vzorků s komerčně dostupným kolagenem z hovězích kůží.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, biologický materiál, přístroje a zařízení

3.1.1 Chemikálie

3.1.1.1 Standardní chemikálie

Bílkovinné standardy

Proteinová směs 4, Serva (SRN)

Proteinová směs 5, Serva (SRN)

Proteinová směs 6, Serva (SRN)

Standard pro gelovou filtraci 1,35 – 670 kDa, BioRad (USA)

Vysokomolekulární standard 36 – 205 kDa, Sigma (SRN)

Hovězí sérový albumin, Sigma (SRN)

Kolagen kuřecí, Typ II, z hrudních chrupavek, Sigma (SRN)

Kolagen roztok, Typ I, z telecí kůže, Sigma (SRN)

Kolagen z hovězích šlach, Typ I, Sigma (SRN)

3.1.1.2 Chemikálie – elektroforéza PAGE-SDS

Akrylamid, Serva (SRN)

β -merkapt ethanol, Serva (SRN)

Bromfenolová modř, Serva (SRN)

Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva (SRN)

Dodecylsírán sodný (SDS), Serva (SRN)

Ethanol, Lachema (ČR)

Glycerol p.a., Lachema (ČR)

Glycin, Penta (ČR)

Kyselina chlorovodíková, Lachema (ČR)

Methanol, Lachema (ČR)

N,N'-methylenbisakrylamid (BIS), Serva (SRN)

N,N'-tetramethylendiamin (TEMED), Sigma (SRN)

Persíran amonný (APS), Serva (SRN)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Serva (SRN)

3.1.1.3 Chemikálie – izolace kolagenu

Chlorid sodný, Lachema (ČR)

Hydroxid sodný, Lachema (ČR)

Kyselina octová, Lach-Ner (ČR)

Triton X-100, Sigma-Aldrich (SRN)

3.1.1.4 Ostatní chemikálie

Bio-Gel P-100 Gel Medium (100 kDa), Bio-Rad (USA)

Experion Pro260 Analysis Kit, Bio-Rad (USA)

Folin-Ciocalteu činidlo, Jan Kulich (ČR)

Fosforečnan sodný kyselý, Lachema (ČR)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-Ner (ČR)
Kolagenáza (*Clostridium histolyticum*), Typ I, Sigma-Aldrich (SRN)
Lidské sérum (Precision Human Multi-Sera, Level 3), RANDOX (UK)
Pepsin (vepřový, ze sliznice žaludku), Sigma-Aldrich (SRN)
Síran meďnatý, Lachema (ČR)
TNBSA – 2,4,6-trinitrobenzensulfonová kyselina, Sigma (SRN)
Uhličitan sodný, Lachema, (ČR)
Vinan sodno-draselný, Lachema (ČR)

Všechny ostatní chemikálie byly standardní čistoty, p.a.

3.1.2 Biologický materiál

- biologické tkáně: kuřecí kůže (celotělová), kuřecí prsní přepážky, krůtí kůže (stehenní), vepřová kůže (koleno), rybí kůže (kapr)
- hovězí kolagen (VÚP Brno, a.s.)
- modifikované vzorky kolagenu, ÚCHM FCH VUT v Brně + zpracovaný rybí kolagen (Polsko)

3.1.3 Přístroje a zařízení

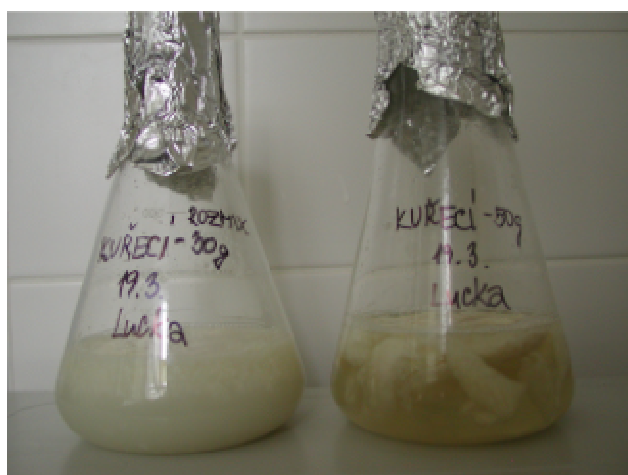
Analytické váhy, Boeco (SRN)
Automatická elektroforetická stanice Experion, Bio-Rad (USA)
Camera Harrison 52 mm, Screw-In (USA)
Centrifuga 3-15, Sigma (SRN)
Elektrický vařič ETA (ČR)
Elektroforetická aparatura P9DS, Owl Separation Systems (USA)
Elektroforetický zdroj EC 1000-90, EC Apparatus Corporation (USA)
Experion priming station, Bio-Rad (USA)
Inkubátor Memmert, Fisher Scientific (ČR)
Mikrocentrifuga chlazená U-32R, Boeco (SRN)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro, (SRN)
Lucia Image aktive 5.0, Laboratory Imaging spol. s r. o. (ČR)
Předvážky Ohaus LS 2000 (SRN)
Přístroj pro nízkotlakou kapalinovou chromatografii BioLogic LP, Bio-Rad (USA)
Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (UK)
Spektrofotometr UV-VIS, Helios α , Unicam (UK)
Tepelný blok Stuart SBH200D (UK)
Třpačka Yellow line, RS10 basic, IKA-WERKE (SRN)
UltraLum, Inc. Electronic Dualware Transilluminátor (USA)
UltraLum, Inc. Ultra Viewer (USA)
Ultrasonic compact cleaner, Powersonic Vráble (SR)
Vodní lázeň EL-20D, Kavalier (ČR)
Vortex TK 3s, Kartell (Itálie)
Waterproof pH Testr 30, Eutech Instruments (USA)

3.2 Postup izolace kolagenu z živočišné tkáně

Jako výchozí biologický materiál byly použity kůže z kuřete, krůty, kapra, kůže z prasečích kolenních kloubů a kuřecí prsní přepážky, vše nakrájené na malé kousky. Ty byly extrahovány po dobu 6 hodin 0,1 M NaOH v Erlenmayerových baňkách na třepačce za snížené teploty (cca do 10 °C). Hydroxid sodný byl během extrakce dvakrát vyměněn za čerstvý roztok. Alkalická hydrolýza by měla odstranit nekolagenové proteiny přítomné v matici [27][28]. K ověření přítomnosti proteinů v louhu byly odebrány vzorky (cca 1 ml), které byly později upraveny k elektroforetické analýze a nanесeny na gel při elektroforéze PAGE-SDS. Poté následovalo promývání materiálu destilovanou vodou až do neutrální reakce.

V dalším izolačním kroku bylo cílem odstranění lipidů z živočišné tkáně, což bylo provedeno pomocí detergentu Tritonu X-100, opět za chladu (4 °C). Následně byly kůže rozmixovány (alternativně byla část kůží – při druhé izolaci v pořadí – rozmixována již před přidáním detergentu). Opět byl materiál několikrát důkladně promyt destilovanou vodou.

Obr. 10: Ukázka jednoho z izolačních kroků kolagenu – odstranění lipidů



Následovala třídní extrakce v 0,5 M kyselině octové při 4 °C, filtrace přes gázu (alternativně u první a druhé izolace odstředění, ale dále se tento krok jevil jako zdlouhavý a bez zvláštního efektu) a vysolení 2,5 M NaCl v přítomnosti 0,05 M Tris (pH 7). Konečným krokem bylo odstředění vláken (zákalu) kolagenu (chlazená centrifuga, 12 000 otáček/min, 10 °C).

Ve spolupráci s ÚCHM FCH VUT v Brně byla část kuřecího (10 g) a krůtího (5 g) vyizolovaného kolagenu lyofilizována na přístroji Lyophilizator LABCONCO, Freeze Dry System/Freezone 4.5.

3.3 Stanovení celkové koncentrace proteinů

Kalibrace na standard kolagenu (hovězí Typ I, Sigma), resp. na aminokyseliny L-cystein (Lachema), DL-lysin (Sigma), DL-prolin (Sigma) a optimalizace následujících metod byla

provedena v rámci bakalářské práce [47], na níž obsahově předložená diplomová práce navazuje.

3.3.1 Biuretová metoda

Tato metoda stanovení celkového obsahu bílkovin ve vzorku je založena na detekci peptidových vazeb a byla použita ke změření koncentrace proteinů modifikovaných kolagenů připravených na ÚCHM FCH VUT v Brně, dále v kolagenních izolátech (kuřecí, krůtí, vepřový, rybí a srovnávací hovězí) a také ke sledování stability těchto izolátů ve třech modelových fyziologických prostředích – fyziologický pufr, fyziologický pufr s kolagenázou (z bakterie *Clostridium histolyticum*, typ I, Sigma-Aldrich) a lidské sérum (Precision Human Multi-Sera, Level 3, Randox).

3.3.1.1 Roztoky

Fyziologický roztok – 9 g NaCl v 1 l dest. vody

Fyziologický pufr – 0,05 M Na₂HPO₄ + 0,9% NaCl

Lidské sérum – obsah každé vialky rozpuštěn v 5 ml fyziologického pufru

Biuretové činidlo – 20,5 g CuCl₂.H₂O + 150 ml ethylenglykolu + 300 g NaOH doplněno na 1 l dest. vodou, 4 h zahřívání na vroucí vodní lázni, ochlazení, filtrace

3.3.1.2 Měření koncentrace bílkovin v biologických vzorcích

Byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých izolátů o koncentraci 4 mg/ml navážením vzorků a přidáním příslušného objemu fyziologického roztoku. Do zkumavek bylo napipetováno 0,25 – 1 ml roztoku bílkovin (za účelem proměření tří různých koncentrací) a doplněno fyziologickým roztokem na 3 ml. Do další zkumavky, která sloužila jako blank, byly napipetovány pouze 3 ml čistého fyziologického roztoku. Ke všem vzorkům bylo přidáno 0,3 ml biuretového činidla, vzorky byly promíchány a po 20 – 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance v 1 cm kyvetách při 550 nm oproti slepému vzorku.

3.3.1.3 Měření koncentrace peptidových vazeb během sledování stability kolagenu

V průběhu testování fyziologické stability kolagenních izolátů byla měřena výchozí koncentrace proteinů a dále po 2, 7, 24 a 48 hodinové inkubaci při 25 a 37 °C (vždy ve třech různých modelových prostředích).

Na každý jednotlivý odběr bylo naváženo 50 mg kolagenu a k nim bylo napipetováno 2,5 ml příslušného roztoku (fyziologický pufr, fyziologický pufr + kolagenáza (10 – 20 mg), lidské sérum). K analýze celkových proteinů bylo z těchto vzorků napipetováno vždy 0,5 – 1 ml. Tři zkumavky, které sloužily jako blanky, obsahovaly 0,5 – 1 ml čistých roztoků třech různých fyziologických prostředí. Vše bylo doplněno fyziologickým pufrem na 3 ml. Přidání činidla, inkubace a měření bylo provedeno jako v kapitole 3.3.1.2.

3.3.2 Hartee – Lowryho metoda

Metoda byla použita k měření koncentrace proteinů v roztocích modifikovaných kolagenů (ve vodě, v octové a mravenčí kyselině; při 4 a 23 °C), které byly připravené na ÚCHM FCH VUT v Brně a srovnávacích vzorků připravených rozpuštěním standardu kolagenu (hovězí

Typ I, Sigma) ve stejných rozpouštědlech za laboratorní teploty (popř. s přidavkem pepsinu (vepřový, Sigma-Aldrich) při 37 °C, kde byla nutná korelace pepsinu pomocí blanku).

3.3.2.1 Roztoky [39]

Roztok A – 2 g vinan sodno-draselný.4 H₂O, 100 g Na₂CO₃, 500 ml 1 M NaOH, doplněno dest. vodou na 1 l

Roztok B – 2 g vinan sodno-draselný.4 H₂O, 1 g CuSO₄.5 H₂O, 90 ml dest. vody, 10 ml 1 M NaOH

Roztok C – zředěn 1 objem Folin-Ciocalteu činidla 15 objemy dest. vody

3.3.2.2 Měření koncentrace celkových proteinů

K 1 ml protein obsahujícího vzorku (alternativně u srovnávacích kolagenních vzorků 1 mg kolagenu v 1 ml rozpouštědla) a čistých rozpouštědel (blanky) bylo přidáno 0,9 ml roztoku A, vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Poté byly ochlazeny na laboratorní teplotu a do každé zkumavky bylo přidáno 0,1 ml roztoku B, vzorky byly protřepány a inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly rychle přidány 3 ml roztoku C, vzorky byly zamíchány a inkubovány 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla měřena absorbance v 1 cm kyvetách při 650 nm oproti příslušnému blanku.

3.3.3 Metoda TNBSA

Kyselina 2,4,6-trinitrobenzensulfonová (TNBSA) je rychlé a citlivé činidlo ke stanovení koncentrace proteinů pomocí volných aminoskupin [48]. Činidlo TNBSA (Sigma) bylo použito ke stanovení volných aminoskupin kolagenních izolátů a uvolněných aminoskupin při testování fyziologické stability kolagenních izolátů ve dvou prostředích – fyziologický pufr, fyziologický pufr + kolagenáza (z bakterie *Clostridium histolyticum*, typ I, Sigma-Aldrich). Stanovení není vhodné pro měření vzorků v lidském séru, jelikož po přidání SDS a HCl došlo k vysrážení (hustá žluto-zelená sraženina).

3.3.3.1 Roztoky [49]

Reakční pufr – 0,1 M NaHCO₃, pH 8,5

Roztok TNBSA – 0,01% roztok TNBSA v reakčním pufru, připraven čerstvý pro každé stanovení

3.3.3.2 Měření volných aminokyselin kolagenních izolátů

Byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých izolátů o koncentraci 0,2 mg/ml navážením vzorků a přidáním příslušného objemu reakčního pufru. Do zkumavek bylo napipetováno 0,125 – 0,5 ml roztoku (za účelem proměření tří různých koncentrací) a doplněno reakčním pufrem na 0,5 ml. Do další zkumavky, která sloužila jako blank, bylo napipetováno pouze 0,5 ml čistého reakčního pufru. Ke všem zkumavkám bylo přidáno 0,25 ml roztoku TNBSA, obsah byl důkladně promíchán a inkubován ve vodní lázni 2 hodiny při 37 °C. Poté bylo přidáno 0,25 ml 10% roztoku SDS (dodecylsírán sodný) a 0,125 ml 1 M HCl. Absorbance byla měřena v křemenných, zúžených 1 cm kyvetách při 335 nm oproti slepému vzorku.

3.3.3.3 Měření uvolněných aminoskupin při testování fyziologické stability

Odběry byly provedeny stejným způsobem jak je popsáno u biuretové metody (viz kapitola 3.3.1.3). K analýze uvolněných aminokyselin bylo pipetováno vždy 0,5 ml vzorku. Dvě

zkumavky, které sloužily jako blanky, obsahovaly 0,5 ml čistých roztoků dvou různých fyziologických prostředí. Další postup přidání činidla, inkubace a měření bylo provedeno stejným způsobem, jako je uvedeno u měření izolovaných kolagenů (viz kapitola 3.3.3.2).

3.4 Analýza kolagenů

3.4.1 Vertikální elektroforéza proteinů metodou PAGE-SDS

K analyzování kolagenních materiálů pomocí gelové elektroforézy musela být nejprve provedena optimalizace této metody na separaci proteinů s molekulovou hmotností nad 100 kDa. Nejdůležitějším kritériem byla správná hustota gelu, aby došlo k viditelné separaci podjednotek kolagenu. Jako standardní bílkoviny byly používány proteinové směsi 4, 5, 6 (Serva), hovězí albumin (Sigma) a vysokomolekulární bílkovinný standard (Sigma).

K elektroforetickému rozdělení bílkovin byla používána vertikální sestava P9DS (16 x 14 cm) složená z elektroforetické vany a zdroje napětí. Nosičem byl polyakrylamidový gel, detekci separovaných proteinů umožnilo barvení pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva), s následným odbarvením pozadí.

3.4.1.1 Roztoky

Zásobní roztok AA/BIS – roztok 40% AA : 3,3% BIS = 29 : 1 (v redestilované vodě)

Elektrodový pufr – 3 g Tris + 14,4 g glycinu + 1 g SDS do 1 l redest. vody

Separální (dělicí) pufr – 18,2 g Tris + cca 2,8 ml 32% HCl na úpravu pH (pH 8,8) do 100 ml redest. vody

Iniciační činidlo – 0,1 g persíranu amonného (APS) do 1 ml redest. vody, připravován pro každou analýzu čerstvý

Vzorkovací pufr – 2,13 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + 5 ml glycerolu + 1 g SDS + 2,56 β-merkaptoethanolu + cca 1 mg bromfenolové modři, doplnit na 10 ml redest. vodou

3.4.1.2 Příprava polyakrylamidového gelu

Nejprve byl napipetován do kádinky zásobní roztok AA/BIS, separální pufr a redestilovaná voda, přičemž pipetované objemy závisely na požadované hustotě gelu (viz *Tabulka 10*). Směs těchto tří látek byla sonifikována po dobu minimálně 3 minut. Poté bylo opatrně po kapkách přidáno 0,4 ml 10% SDS v redestilované vodě, 0,06 ml TEMED a 0,24 – 0,3 ml APS, kterým byla zahájena polymerace gelu. Směs byla opatrně zamíchána a nalita do prostoru mezi dvě skla umístěná v nalévacím stojanu. Svrchu byl do gelu umístěn plastový hřeben k vytvoření jamek v gelu pro pozdější nanesení vzorků. Gel byl ponechán polymerovat na světle za laboratorní teploty několik hodin.

Tabulka 10: Objemy roztoků na přípravu polyakrylamidového gelu, v závislosti na jeho hustotě

roztoky (ml)	hustota gelu							
	15%	12,5%	10%	9%	8%	7,5%	7%	6%
zásobní roztok AA/BIS	15	12,5	10	9	8	7,5	7	6
separační pufr	10	10	10	10	10	10	10	10
redest. H ₂ O	14,6	17,1	19,6	20,6	21,6	22,1	22,6	23,6

3.4.1.3 Příprava vzorků na elektroforézu

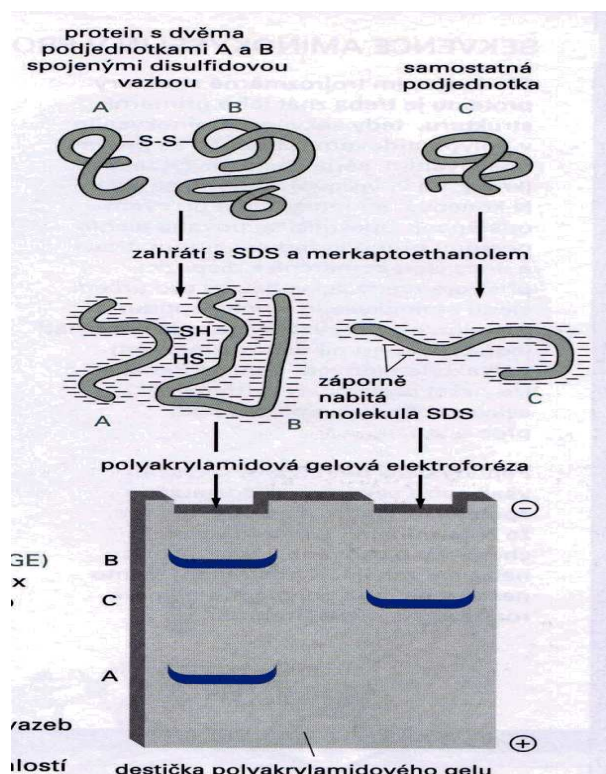
Vzorky roztoků kolagenů (popř. byla odebrána část nerozpuštěné frakce kolagenu, nebo byl přidán pepsin) byly smíchány se vzorkovacím pufrům v poměru 1 : 1, pokud bylo třeba, bylo upraveno pH vzorků na cca 8 pomocí 1 M NaOH, a poté byly povařeny na vodní lázni minimálně po dobu 5 minut. Po nanesení na elektroforézu byly vzorky uchovány pro další použití při -20°C.

Vysokomolekulární bílkovinný standard (Sigma) byl dle výrobce naředěn 100 µl redestilované vody. Později bylo ředění optimalizováno na cca 34 µl (1 vialka na 3 nanášky po 10 µl) z důvodu lepší viditelnosti separovaných bílkovin v gelu.

3.4.1.4 Provedení elektroforézy

Skleněné desky s gelem uprostřed byly přeneseny do elektroforetické aparatury, kde byly důkladně připevněny pomocí šroubovacích úchytných lišt tak, aby nevytékal elektrodový pufr, který byl následně nalit do elektrodového prostoru i do elektroforetické vany po vyznačenou rysku. Po odstranění hřebene z gelu byly nanášeny vzorky do jamek v množství 10 – 15 µl. Poté byla nádoba uzavřena pomocí průhledného horního dílu elektroforetické aparatury a připojena ke zdroji napětí. Volba velikosti proudu, napětí i délky separace byla předmětem optimalizace metody pro kolagenní materiály. Po ukončení procesu dělení bílkovin byl gel opatrně vyjmut ze skleněných desek a následovalo jeho barvení.

Obr. 11: Elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS [50]



3.4.1.5 Barvení gelu, odbarvení pozadí a vyhodnocení

Barvicí roztok – 500 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, doplnit vodou na 1 l

Odbarvovací roztok – 150 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové, doplnit na 1 l vodou

Po skončení elektroforézy byl gel opatrně přenesen do plastové nádoby s ethanolem, poté byl opláchnut destilovanou vodou a ponořen na cca 3 minuty do barvicího roztoku za protřepávání. Následovalo propláchnutí již použitým odbarvovacím roztokem a ponoření do čerstvého odbarvovacího roztoku, kde byl za mírného třepání odbarvován cca 4 – 12 hodin. Délka odbarvování závisí na viditelnosti obarvené bílkoviny na pozadí.

Po odbarvení byl gel vyfocen kamerou UltraCam (Pharmacia Biotech) za použití Electronic Dualwave transilluminátoru (Pharmacia Biotech), případně pro získání barevného provedení naskenován.

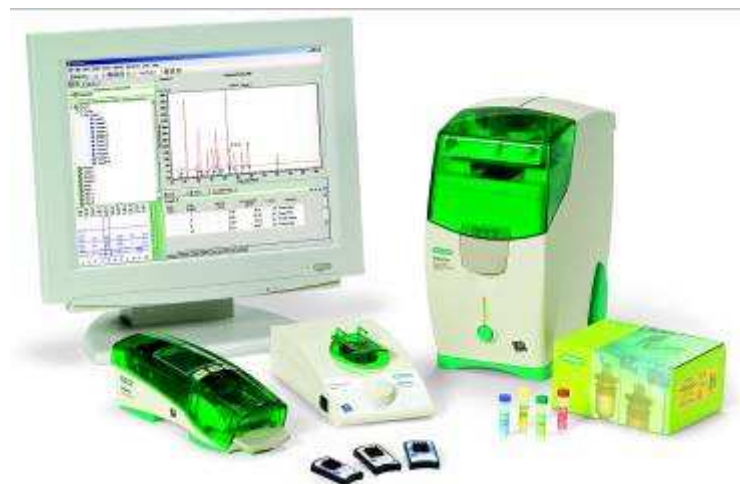
Velikost fragmentů separovaných bílkovin byla určována pomocí standardů o známé molekulové hmotnosti, které byly nanесeny na stejný gel zároveň se vzorky.

3.4.2 Separace pomocí mikrofluidního elektroforetického systému Experion (Bio-Rad, USA) [51]

Zařízení pro mikročipovou elektroforézu Experion od firmy Bio-Rad (USA) bylo použito jako rychlá srovnávací metoda k PAGE-SDS, která je poměrně časově náročná. Separace na čipu trvá maximálně do 30 minut a každý čip může být použit k analýze 10 vzorků. Systém dokáže detekovat proteiny od 10 do 260 kDa. Kromě proteinů lze analyzovat také RNA.

Systém se skládá z automatické elektroforetické stanice, nanášecí stanice pro gel, vortexu, kitu pro analýzu s čipy (včetně čistícího čipu) a softwaru na zpracování dat (viz *Obr. 12*). Kit se skládá z proteinového standardu Pro260 ladder, vzorkovacího pufru (který obsahuje nejmenší a největší marker ze standardu), gelového roztoku Pro260 gel, fluorescenčního barviva Pro260 stain a filtrů k přefiltrování gelových roztoků. Všechny roztoky musí být uchovávány při 4 °C, barvivo a vzorkovací pufr musí být navíc chráněny před světlem. Jednotlivé roztoky jsou od sebe odlišeny barevnými vialkami i s víčky a manipulace s nimi je tedy velmi jednoduchá.

Obr. 12: Systém pro mikročipovou elektroforézu Experion od firmy Bio-Rad



3.4.2.1 Příprava roztoků a vzorků

Před použitím musí být roztoky ponechány k ustálení na laboratorní teplotu (15 – 20 minut), poté všechny krátce zvortexovány a řádně stočeny v minicentrifuze.

Prvním krokem je příprava roztoku barvicího gelu přidáním 20 µl Pro260 stain k celému objemu vialky (520 µl) Pro260 gel, vortex 10 sekund, stočení, přefiltrování roztoku. Filtrace se provádí také s druhou vialkou Pro260 gel. Oba roztoky se stočí při 10 000g po dobu 5 minut. Přefiltrované roztoky je možné používat jeden měsíc, poté by bylo nutné je přefiltrovat znovu.

Vzorkovací pufr musí být připraven každý den čerstvý. Pro separaci proteinů za redukčních podmínek se přidá 1 µl β-merkapt ethanolu ke 30 µl vzorkovacího pufru.

Ke 4 µl proteinového standardu Pro260 ladder se přidají 2 µl připraveného vzorkovacího pufru, stejně se připraví i vzorky k analýze. Pečlivě se vortexují, krátce stočí a povaří 3 – 5 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se vzorky i standard opět stáčí po dobu 15 sekund. Poté se přidá 84 µl deionizované vody a směsi se zvortexují, tím jsou vzorky připraveny k nanášení na čip.

3.4.2.2 Nanášení gelu a vzorků na mikročip

Čip se umístí do nanášecí stanice, napipetuje se 12 µl roztoku gelu s barvivem do horní, modře zvýrazněné jamky v pravém rohu čipu označené GS (viz Obr. 13), stanice se uzavře, nastaví se tlak a čas (dle výrobce). Při pipetování je nutné dbát na to, aby se netvořily bubliny v gelu, které by mohly bránit správné polymeraci gelu. Do 60 sekund zvukový signál indikuje, že nastříknutí gelu je kompletní, stanice může být otevřena, čip vyjmut a vizuálně zkontrolován, zda se v mikrokanálcích nenacházejí bubliny, či zda je nastříknutí gelu kompletní.

Poté je možné čip zpátky umístit do stanice kvůli snadnějšímu pipetování, nebo lze pokračovat s čipem položeným na čistém povrchu. Z první jamky se zbytek gelu odstraní a poté se pipetuje opět 12 µl gelového roztoku s barvivem do všech čtyřech jamek označených GS a 12 µl gelu do jamky označené G.

Následuje nanášení vzorků do každé z jamek označených čísly 1 – 10 a proteinového standardu Pro260 ladder do jamky označené L v množství 6 µl. Opět je třeba kontrolovat, zda se nevytvořily velké bubliny (akceptovatelné jsou 1 – 2 malé bublinky).

Obr. 13: Jednotlivé označené pozice čipu pro nanášení roztoků

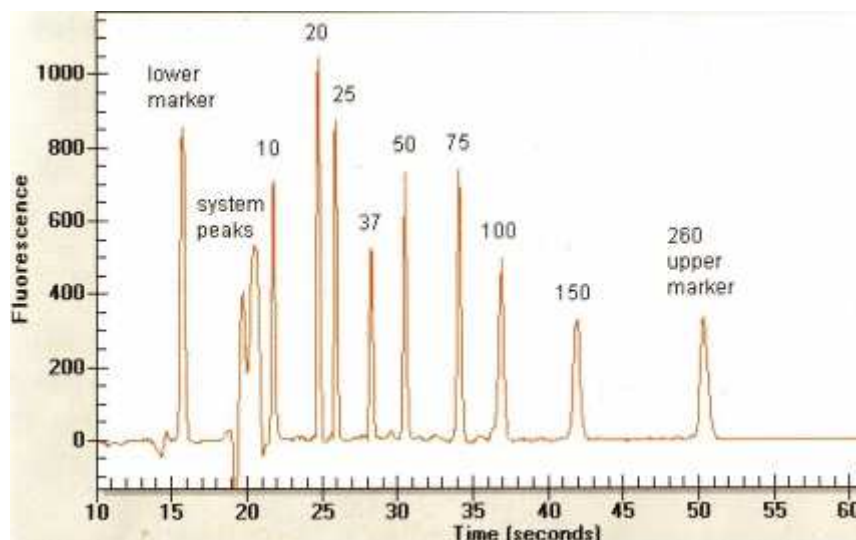


3.4.2.3 Analýza proteinů na mikročipu

Po nanesení vzorků a standardu je třeba ihned začít s analýzou umístěním čipu do elektroforetické stanice, otevřením programu Experion a spuštěním analýzy. Po ukončení analýzy je třeba vyčistit elektrody umístěním čistícího čipu s 800 µl deionizované vody do elektroforetické stanice, kde byl ponechán cca 60 sekund a poté byla stanice ještě 60 sekund otevřená k oschnutí elektrod.

Během separace zobrazuje software elektroforeogram právě separovaného vzorku nebo standardu (první v pořadí), který obsahuje 9 píků. První je dolní marker (1,2 kDa), poslední horní marker (260 kDa) a píky mezi dolním markerem a prvním píkem standardu (10 kDa) jsou systémové píky (viz *Obr. 14*). Pokud je separace úspěšná, software identifikuje molekulární hmotnost všech devíti píků standardu, ve vzorcích identifikuje dolní a horní marker a tak dokáže spočítat molekulovou hmotnost proteinu ve vzorku. Je schopen určit i koncentraci proteinu.

Obr. 14: Ukázka elektroforeogramu Pro260 ladderu softwaru Experion



3.4.3 Gelová chromatografie

V rámci předložené práce byl uveden do provozu nový přístroj pro nízkotlakou kapalinovou chromatografii BioLogic LP od firmy Bio-Rad (USA). Jako náplň kolony byl použit Bio-Gel P-100, což je polyakrylamidový nosič s exkluzním limitem 100 kDa. Jako mobilní fáze byla používán 0,1 M Tris/HCl pufr o pH 7,4. Separace probíhala na skleněné koloně o rozměrech 2,5 x 20 cm.

Po uvedení přístroje do provozu a připojení kolony byl nastaven rozsah průtokového UV fotometru, který kontinuálně zaznamenává absorbanci při 280 nm a též rozsah vodivostní cely, která kontinuálně registruje vodivost eluátu. Nabobtnalý gel byl nanesen do kolony a sloupec byl kondicionován pufrem po dobu 12 hodin. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min (tedy 30 ml/hod). Výstup z kolony byl kontinuálně monitorován pomocí absorbance při 280 nm (monitoring koncentrace proteinů) a vodivosti. Frakční kolektor nebylo nutné použít, je však součástí systému.

Nejprve byl analyzován standard pro gelovou chromatografii obsahující 5 proteinů o známé molekulové hmotnosti (Gel Filtration Standard, BioRad): thyreoglobulin 670 kDa, gama-globulin 158 kDa, kuřecí ovalbumin 44 kDa, myoglobin 17 kDa a kobalamin 1,35 kDa. Metoda byla využita jak k charakterizaci vzorků kolagenu, tak i k purifikaci od jiných proteinů a současně k odsolení zbytků NaCl po vysrážení.

Touto metodou byl analyzován kuřecí kolagen izolovaný z kůží a surový hovězí kolagen z průmyslu. Oba vzorky byly v koncentraci 100 mg/ml rozpuštěny v mobilní fázi (0,1 M Tris,

pH 7,4) s přidavkem pepsinu (cca 100 mg/3 ml). Hovězí kolagen se obtížně dostává do roztoku, proto byl ještě před analýzou okyselen 0,5 M kyselinou octovou.

Obr. 15: Přístroj pro nízkotlakou gelovou chromatografii BioLogic LP od firmy Bio-Rad



3.4.4 Aminokyselinové složení kolagenových vzorků

V rámci předložené diplomové práce byla provedena analýza aminokyselinového složení vzorků kolagenů izolovaných z kuřecích a krůtích kůží a také vzorku surového hovězího kolagenu. Všechny tři vzorky byly v lyofilizované formě k této analýze odeslány na Veterinární a farmaceutickou univerzitu Brno, kde byla tato analýza provedena v rámci komerčního stanovení. Podle protokolu byly aminokyseliny stanoveny kyselou hydrolýzou 6 N HCl po dobu 24 hodin při 110 °C. Tato metoda není vhodná pro stanovení sirných aminokyselin. Jejich hodnota po kyselé hydrolýze je nižší než odpovídá skutečnosti.

3.5 Studium stability izolovaných kolagenů

Za účelem náhrady používání hovězího kolagenu kolagenem z jiných živočišných zdrojů byl kolagen izolován z kuřecích, krůtích, rybích, vepřových kůží a také z kuřecích hrudních chrupavek. Všechny tyto izoláty bylo třeba podrobit alespoň orientačnímu testování jejich stability. Jako vhodné parametry k testování byly vybrány teplota a různá prostředí k simulaci modelového fyziologického prostředí, vždy v porovnání s hovězím kolagenem získaným komerčně.

3.5.1 Testování tepelné stability kolagenů

K testům byl použit kolagen izolovaný z kuřecích, krůtích a rybích kůží (podle množství izolovaného materiálu) a surový hovězí kolagen. Každý vzorek pro každou teplotu byl

navážen samostatně v množství cca 0,4 g kolagenu a bylo přidáno 0,5 ml 0,5 M kyseliny octové v malých vialkách. Vialky byly následně umístěny do tepelného bloku na 1 hodinu. Teplotní rozsah testování byl prováděn od 25 °C do 60 °C po 5 °C krocích a od 70 °C do 90 °C po 10 °C (s výjimkou krůtího kolagenu, u kterého z důvodu nedostatku materiálu proběhlo testování pouze u teplot 25, 30, 35, 40, 50, 60 °C).

Po hodinové inkubaci v tepelném bloku byly vzorky uloženy do lednice, k některým z nich byl přidán pepsin za účelem lepšího rozpuštění kolagenu, a později byly odebrány vzorky (upraveny postupem uvedeným v kapitole 3.4.1.3) k analýze vertikální elektroforézou PAGE-SDS (viz kapitola 3.4.1.4., 3.4.1.5).

Tepelná a současně strukturní stabilita kolagenových vzorků byla testována i ve spolupráci s ÚFSCH FCH VUT v Brně pomocí ultrazvukové spektroskopie na přístroji HRUS 102 firmy Ultrasonic Scientific, frekvence měření byla 11 950 kHz. Měření byl vždy 1 ml každého vzorku v cele 1, jako referenční roztok byla v cele 2 destilovaná voda (kromě vzorku kolagenu z kuřecích hrudních chrupavek, tam byly omylem vyměněny cely). Teplotní režim byl od 25 °C do 85 °C během 6 hodin (cca 0,16 °C/min) a pak zpět na 25 °C po dobu 3 hodin. Vzorek byl během experimentu promícháván míchadlem na dně cely (600 ot /min).

3.5.2 Testování biologické stability kolagenů

Testování by mělo simulovat chování kolagenových vzorků v modelovém fyziologickém prostředí. Pro pilotní testy byla použita tři různá prostředí, a to fyziologický pufr, lidské sérum (Randox) a kolagenáza (Sigma-Aldrich) rozpuštěná ve fyziologickém pufru. Testy byly provedeny při dvou různých teplotách – 25 °C jako laboratorní teplota používaná pro přípravu vzorků a 37 °C jako modelové fyziologické prostředí lidského organismu. Jako testovací materiál byly použity izolované kolageny z kuřecích, krůtích, rybích a vepřových kůží a surový komerční hovězí kolagen.

3.5.2.1 Roztoky

Fyziologický pufr – 0,05 M Na-fosfátový pufr + 0,9% NaCl:

29,009 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ + 2,622 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ doplnit na 1 l destilovanou vodou, zředit základní pufr 1 : 1 + přídavek NaCl (9 g/l).

Lidské sérum – Precision Human Multi-Sera, Level 3: obsah každé vialky (lyofilizát) rozředěn 5 ml fyziologického pufru.

Roztok kolagenázy – 10 – 20 mg kolagenázy v 2,5 ml fyziologického pufru

3.5.2.2 Provedení experimentu a způsob analýzy

Vzorky kolagenů byly navažovány vždy samostatně pro každé prostředí i teplotu do vialek nebo malých zkumavek v množství cca 50 mg. K nim bylo napipetováno 2,5 ml buď čistého fyziologického pufru, ředěného lidského séra nebo fyziologického pufru obsahujícího 10 – 20 mg kolagenázy. Vzorky při 25 °C byly ponechány k inkubaci volně v laboratoři, vzorky při 37 °C byly inkubovány v termostatu. Inkubace se všemi vzorky probíhala postupně nejprve 2 hodiny, potom 7, 24 a 48 hodin (byly připraveny vždy samostatné vzorky ke každé inkubaci – podle množství dostupného kolagenového materiálu byly některé odběry u vybraných kolagenů v průběhu testování vynechány).

Další sada vzorků sloužila jako výchozí, kdy ihned po navážení kolagenů a přidání roztoků byly vzorky analyzovány. Současně byly připraveny jako blanky vzorky všech prostředí bez kolagenu pro obě používané kolorimetrické metody. Analýza probíhala měřením peptidových vazeb biuretovou metodou postupem uvedeným v kapitole 3.3.1.3, dále byla měřena koncentrace volných aminokyselin metodou TNBSA, postup uveden v kapitole 3.3.3.3. U metody TNBSA nebylo možné analyzovat vzorky v lidském séru z důvodu vysrážení vzorku po přidání SDS a HCl (viz postup při měření metodou TNBSA, kapitola 3.3.3.2). Po 48- hodinové inkubaci byly z obou testovacích sad (při 25 °C i 37 °C) odebrány vzorky k elektroforetické analýze kolagenu metodou PAGE-SDS. Vzorky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.4.1.3 a separace a barvení proběhly postupem popsáním v kapitolách 3.4.1.4 a 3.4.1.5.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Mikroskopie modifikovaných kolagenních materiálů z ÚCHM

V první fázi práce byly analyzovány modifikované kolagenní materiály připravené na ÚCHM FCH VUT v Brně. Cílem bylo ověřit molekulární charakteristiky modifikovaných kolagenů po provedených úpravách komerčního hovězího kolagenu. Současně byly tyto vzorky použity spolu se standardy kolagenu k optimalizaci metod.

Ve spolupráci s ÚSFCH FCH VUT v Brně byly pořízeny mikroskopické snímky některých vybraných kolagenových materiálů světelným mikroskopem s vrchním osvětlením a zaznamenány pomocí fotoaparátu, který je spojen přímo s mikroskopem.

Obr. 16: Ukázka kolagenových materiálů pod světelným mikroskopem



Z mikroskopických snímků je patrné, že různé způsoby mechanického zpracování kolagenu mají za následek změny výsledné prostorové struktury kolagenových preparátů, což by mohlo mít význam zejména z hlediska použitelnosti v biomedicínských aplikacích. Cílem dalších experimentů bylo ověřit molekulární charakteristiky těchto preparátů.

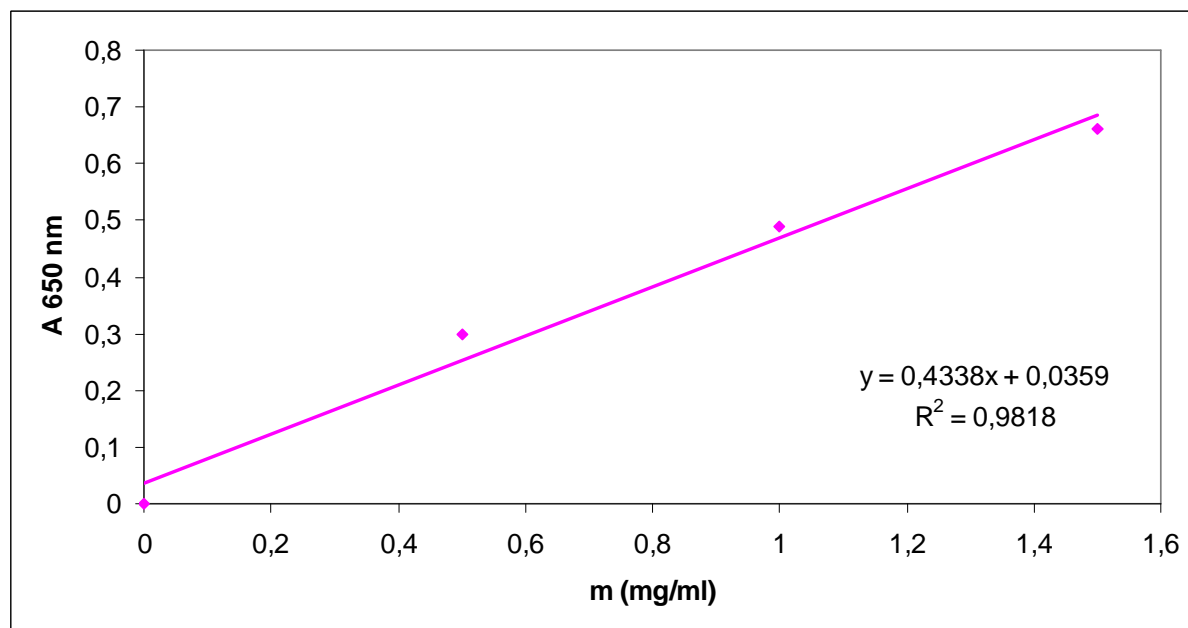
4.2 Měření koncentrace celkových proteinů u modifikovaných kolagenních materiálů

Přehled používaných modifikovaných kolagenů uvádí *Tabulka 20: Seznam používaných modifikovaných kolagenních materiálů získaných z ÚCHM FCH VUT v Brně*, str. 67. Koncentrace různých roztoků kolagenu byly měřeny metodou Hartree – Lowryho, lyofilizáty kolagenu metodou biuretovou.

4.2.1 Metoda Hartree – Lowryho

Kalibrační závislost byla změřena na standardu hovězího nerozpustného kolagenu (Sigma) [47]. Vzorky byly proměřeny způsobem popsaným v kapitole 3.3.2.2, vždy 2 – 3 x paralelně, uvedená hodnota absorbance je jejich průměrem. Jelikož byly vzorky příliš koncentrované, při měření absorbance byly všechny 3 x zředěny destilovanou vodou.

Graf 1: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace bílkovin Hartree – Lowryho metodou (Kolagen) [47]



Tabulka 11: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení koncentrace proteinů modifikovaných kolagenů metodou Hartree – Lowryho

roztok kolagenu	A _{650 nm}	obsah proteinů (mg/ml) – zředěné 3 x	obsah proteinů (mg/ml)
ve vodě 23 °C	0,5050	1,081	3,244
v kys. octové 23 °C	0,5340	1,148	3,445
v kys. mravenčí 23 °C	0,5210	1,118	3,355
ve vodě 4 °C	0,4965	1,062	3,185
v kys. octové 4 °C	0,5470	1,178	3,535
v kys. mravenčí 4 °C	0,5525	1,191	3,573

Tabulka 12: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení koncentrace roztoků standardního hovězího kolagenu metodou Hartree – Lowryho

	A _{650 nm}	obsah proteinů (mg/ml)
roztok kolagenu (navážka 1mg/ml)		
ve vodě 23 °C	0,7295	1,599
ve vodě 4 °C	0,5330	1,146

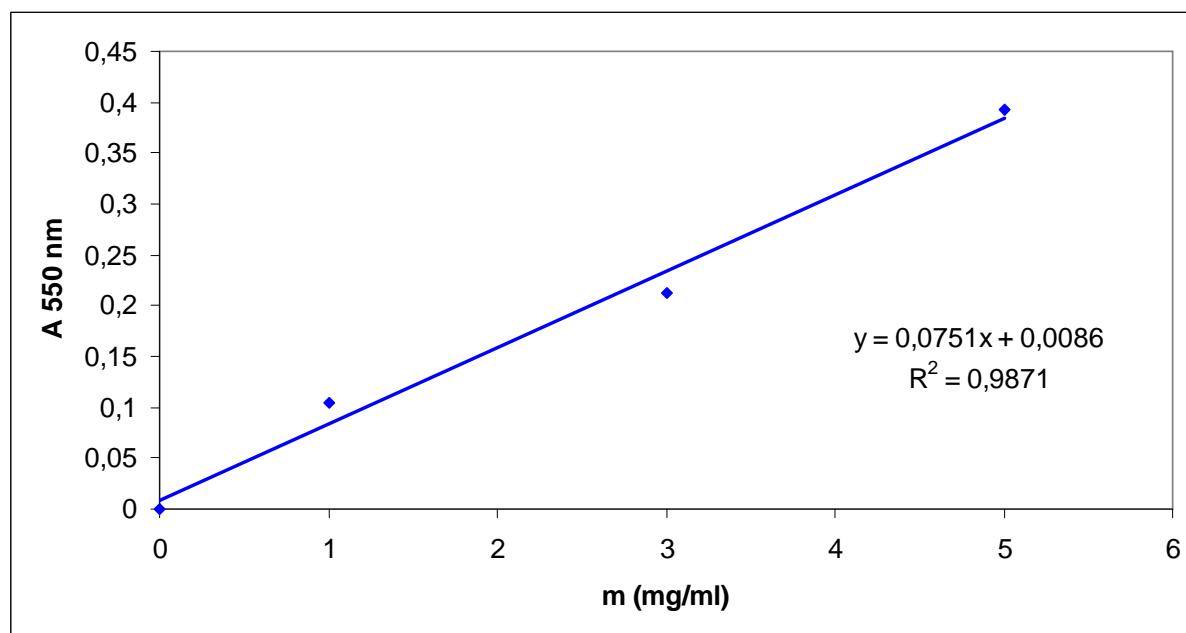
roztok kolagenu (1mg/ml) s pepsinem (lab. teplota) (koncentrace pepsinu korigována přítomností v blanku)		
ve fyziologickém roztoku	0,4797	1,023

Hodnoty uvedené v *Tabulka 12* potvrzují, že metoda Hartree-Lowryho je relativně dobře použitelná k analýze koncentrace proteinů ve zředěnějších roztocích a že tedy údaje zjištěné v *Tabulka 11* odpovídají realitě. Hodnoty celkové koncentrace proteinů ve vzorku jsou důležité pro odhad nutného množství preparátů pro další analýzy, zejména pro elektroforézy.

4.2.2 Biuretová metoda

Nejprve byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci standardních roztoků o známé koncentraci kolagenu. Následně byla tato kalibrační závislost použita ke zpětnému ověření koncentrace ve standardních roztocích [47]. Příprava vzorků zahrnovala rozpuštění určitého množství vzorku (dle množství materiálu) v 0,1 M kyselině octové při 37 °C a přidavek pepsinu, jehož koncentrace byla korigována v blanku, následovné měření probíhalo dle postupu popsáno v kapitole 3.3.1.2. Vzorky byly proměřeny vždy ve dvou až třech paralelních sadách, uveden je průměr hodnot absorbance.

Graf 2: Kalibrační závislost pro stanovení koncentrace bílkovin Biuretovou metodou (kolagen) [47]



Tabulka 13: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení koncentrace proteinů kolagenových lyofilizátů Biuretovou metodou

vzorek kolagenu (navážka (mg/ml))	A_{550 nm}	koncentrace proteinů v roztoku (mg/ml)	relativní koncentrace proteinů (koncentrace/navážka)
surový lyofil. kolagen (76,6)	0,2950	3,814	0,0498
dezintegrovaný lyofil.	0,3740	4,866	0,2351

kolagen (20,7)			
pasírovaný lyofil. kolagen (13,4)	0,4640	6,064	0,4525
atelokolagen (22,6)	0,6670	8,767	0,3879
2/B2 dezintegrováný lyofil. kolagen (10,8)	0,7467	9,828	0,9100
2/B6 dezintegrováný lyofil. kolagen (10,5)	0,6403	8,412	0,8011
hovězí surový kolagen (175,8)	0,2990	3,867	0,022

Jelikož roztoky jednotlivých vzorků byly připravovány z různě velkých navážek (dle dostupného materiálu), byla navíc vypočtena jakási „relativní koncentrace celkových proteinů“ (podíl vypočtené koncentrace proteinů v roztoku a navážky vzorku), za účelem porovnání celkového obsahu bílkovin v modifikovaných kolagenech.

Z relativních hodnot lze potom konstatovat, že největší obsah proteinů mají dezintegrované vzorky, následuje pasírovaný lyofilizát. Nejnižší obsah je u komerčního surového hovězího kolagenu, přičemž jeho lyofilizací se obsah proteinů přibližně zdvojnásobí.

Charakterizace a zpracování vzorků kolagenu je mimořádně komplikované a je ztíženo omezenou rozpustností proteinu a změnami konformace v roztoku (viz str. 16, kapitola 2.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti kolagenu [1]).

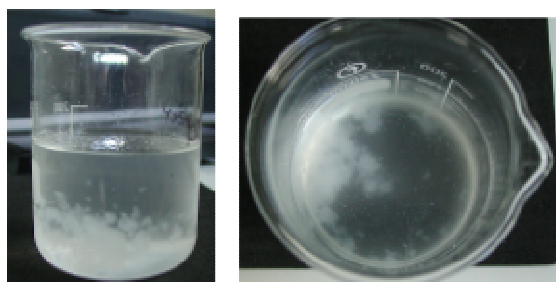
4.3 Izolace kolagenu z různých druhů živočišného materiálu

Izolace kolagenu z živočišného materiálu zahrnuje sekvenci extrakčních a srážecích technik, přičemž je třeba optimalizovat poměry výchozího materiálu a objemu a koncentrace použitých činidel.

V rámci prvních izolačních experimentů byly k izolaci kolagenu použity kuřecí a krutí kůže, a to z důvodu poměrně velkého rozšíření chovu drůbeže u nás a tudíž potenciální možnosti využití kůží jakožto odpadního produktu k izolaci kolagenu. Jako výchozí navážka při prvním pokusu izolace bylo zvoleno 2 x 20 g kůží. Jelikož první izolace neposkytla dostatečný výtěžek, v dalším pokusu byl použit opět stejný materiál v navážkách 30 a 50 g z každého druhu kůže. Tato izolace již poskytla dostatečný výtěžek kolagenu, který bylo možné dále charakterizovat.

V dalších izolačních experimentech následovala izolace z kůže vepřové (koleno) a kůže rybí (kapr) a také z kuřecí hrudní (sternální) chrupavky, kde by měl být přítomen převážně kolagen typu II na rozdíl od kolagenu dermálního, kde převažuje typ I (viz str. 14, *Tabulka 2: Typy a výskyt známých kolagenů*). Navážky byly opět okolo 30 a 50 g.

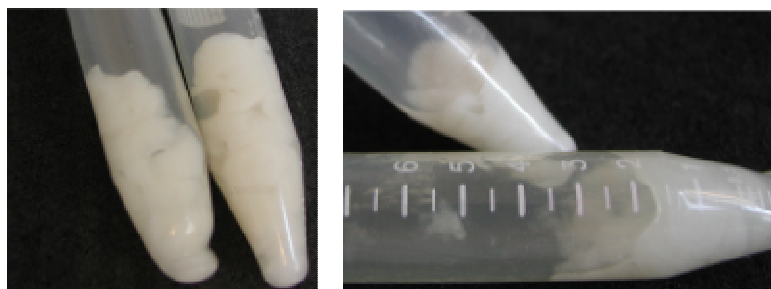
Obr. 17: Ukázka kolagenu v roztoku po vysolení (z kuřecích hrudních chrupavek)



Účelem poslední série izolací bylo získání dalšího materiálu k podrobnějšímu testování vlastností izolovaného kolagenu. Izolace byla provedena pouze z kuřecích a krůtích kůží, avšak z několikanásobně vyššího výchozího množství oproti předcházejícím pokusům.

Postup izolace kolagenů z živočišných tkání je uveden v kapitole 3.2. Výtěžky byly váženy jako surový vlhký odstředěný materiál po izolaci – vlhká hmotnost.

Obr. 18: Ukázka izolovaného produktu – kolagen z kuřecích a krůtích kůží



Tabulka 14: Výtěžky kolagenu z jednotlivých izolací

izolační pokus	biologický materiál	navážka (g)	výtěžek (g)	výtěžek (%)
1	kuřecí kůže	20,4	–	–
		20,6		
	krůtí kůže	20,8	–	–
		20,2		
2	kuřecí kůže	30,6	3,68	12,03
		50,1	4,76	9,50
	krůtí kůže	30,4	3,89	12,80
		50,4	2,55	5,06
3	vepřové kůže	31,1	1,90	6,11
	rybí kůže	51,9	7,27	14,01
	kuřecí hrudní chrupavky	30,2	0,37	1,23
4	kuřecí kůže	165,0	~ 34	12,55
		54,7		
		51,3		
	krůtí kůže	161,7	~ 8	4,95

Z uvedené tabulky je zřejmé, že nejvyššího procentuálního výtěžku bylo dosaženo z rybích kůží, k vyšším výtěžkům vedly i izolace z kůží kuřecích, kde ovšem vyšší výtěžek byl získán vždy při nižší navážce, stejně jako u kůží krůtích (viz

Tabulka 14, 2. izolační pokus). Pro zpracování většího množství biologického materiálu by zřejmě bylo třeba dále optimalizovat objemy použitých činidel. Velký rozdíl ve výtěžnosti z krůtích kůží (30 g versus 50 g navážka) lze vysvětlit nehomogenitou materiálu, tzn. záleželo na podílu obsaženého tuku v dané frakci kůží, poněvadž krůtí kůže byly poměrně tučné. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo z kuřecích hrudních chrupavek.

4.3.1 Stanovení obsahu vody v izolovaných preparátech kolagenu

Ke zjištění obsahu vody v kolagenech izolovaných z kuřecích a krůtích kůží byla provedena ve spolupráci s ÚCHM FCH VUT v Brně lyofilizace vzorků. Pro srovnání byl lyofilizován i komerční surový hovězí kolagen. Přesně navážená množství vzorků kolagenu byla nanesena v tenké vrstvě na plastové Petriho misky a ty byly vloženy do lyofilizátoru na 2 dny. Poté byly lyofilizáty opět zváženy a použity k analýze aminokyselinového složení kolagenových vzorků (viz kapitola 3.4.4).

Obr. 19: Lyofilizované vzorky kolagenu z kuřecích a krůtích kůží a surového hovězího kolagenu



Tabulka 15: Obsah vody izolovaných kolagenů (kuřecí, krůtí) a surového hovězího kolagenu

biologický materiál	navážka (g)	hmotnost vzorků po lyofilizaci (g)	podíl suchého kolagenu (%)	obsah vody (%)
kolagen izolovaný z kuřecích kůží	10,1830	1,9787	19,43	80,57
kolagen izolovaný z krůtích kůží	4,9226	0,9752	19,81	80,19
surový hovězí kolagen	8,0216	0,7916	9,87	90,13

Obsah vody zjištěný pomocí lyofilizace vzorků je pouze přibližný a je uveden jako procentuální dopočet k podílu suchého lyofilizovaného kolagenu. Lyofilizací však byla do jisté míry potvrzena kvalita drůbežích preparátů, které v surovém stavu obsahují přibližně dvojnásobnou koncentraci kolagenu než dodávaný komerční preparát.

Z uvedených hodnot vyplývá, že nejvyšší obsah vody má surový hovězí kolagen, od výrobce je deklarováno, že se jedná o kolagenní hmotu z 8% roztoku (viz Tabulka 20), což je hodnota blízká zjištěné hodnotě podílu suchého hovězího kolagenu po lyofilizaci (9,87 %).

4.4 Koncentrace bílkovin u izolovaných kolagenních vzorků

Toto měření sloužilo jednak ke zjištění koncentrace proteinů v izolovaných kolagenech z různých živočišných tkání. Informace je nezbytná k přípravě vzorků pro další analýzy a také jako výchozí informace k testování těchto izolátů v modelovém fyziologickém prostředí, kde byly využity stejné metody k hodnocení stability kolagenů.

4.4.1 Měření celkové koncentrace bílkovin a volných aminoskupin v izolovaných kolagenech

U vyizolovaných kolagenů z kuřecích, krůtích, vepřových a rybích kůží a také u hovězího surového kolagenu byla změřena koncentrace celkových proteinů (peptidových vazeb) metodou biuretovou a koncentrace volných aminokyselin metodou TNBSA.

4.4.1.1 Biuretová metoda

Kalibrační závislost absorbance na koncentraci standardních roztoků hovězího kolagenu o známé koncentraci viz kapitola 4.2.2, *Graf 2*. Příprava vzorků a měření probíhalo dle postupu popsaného v kapitole 3.3.1.2. Vzorky byly proměřeny vždy ve dvou paralelních sadách, uveden je průměr hodnot absorbance.

Tabulka 16: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení koncentrace proteinů kolagenových izolátů biuretovou metodou

	navážka					
	4 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	4 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml
vzorek kolagenu	A _{550 nm}			vypočtený obsah proteinů (mg/ml)		
kuřecí	0,0795	0,0400	0,0360	0,944	0,418	0,365
krůtí	0,1130	0,0525	0,0235	1,390	0,585	0,198
hovězí	0,0505	0,0535	0,0390	0,558	0,598	0,405
vepřový	0,1895	0,1065	0,0720	2,409	1,304	0,844
rybí	0,0840	0,0485	0,0130	1,004	0,531	0,059

Z naměřených hodnot je patrné, že se snižující se navážkou proteinu se snižuje i vypočtená koncentrace peptidových vazeb dle kalibrace na standard hovězího kolagenu (Sigma) (s výjimkou prvních dvou koncentrací u hovězího kolagenu). Navážky vzorků byly ve vlhkém stavu, což je důvodem téměř řádového rozdílu v hmotnostech mezi navážkami a vypočtenou koncentrací proteinů. Standard, na který byla naměřena kalibrační závislost, byl vážen v suchém stavu.

Metoda poskytuje orientační představu o skutečné koncentraci proteinů v izolovaných kolagenových preparátech, tedy umožňuje jednak lepší odhad potřebné nanášky na elektroforézu a vypovídá rovněž částečně o obsahu vody a dalších příměsí u izolovaných preparátů.

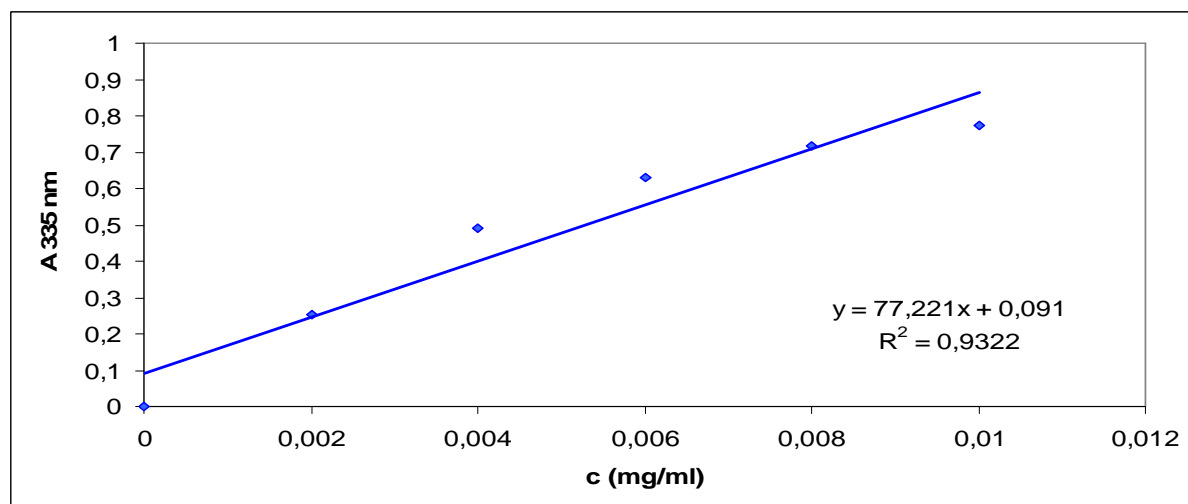
4.4.1.2 Metoda TNBSA

Kalibrační závislost byla měřena u tří strukturně odlišných aminokyselin cysteinu, lysinu a prolinu. Každá z testovaných aminokyselin reagovala s činidlem TNBSA velmi specificky a

ze získaných výsledků je patrné, že kvalita jednotlivých kalibračních závislostí se liší podle typu použité aminokyseliny [47].

TNBS reaguje především s primárními aminoskupinami, podle některých autorů nereaguje s dusíkem prolinu [52]. V alkalickém pH reaguje TNBS s terminálními α -aminoskupinami a stejně tak i s ϵ -aminoskupinami lysinu uvnitř řetězce. Pro sledování proteolýzy v bakalářské práci [47] byla s ohledem na výše uvedené skutečnosti využita kalibrační závislost sestavená pro lysin, proto tato kalibrace byla využita i v předložené diplomové práci, která obsahově navazuje. Příprava vzorků a měření bylo provedeno postupem popsáním v kapitole 3.3.3.2. Vzorky byly proměřeny vždy ve dvou paralelních sadách, uveden je průměr hodnot absorbance.

Graf 3: Kalibrační závislost pro stanovení volných aminoskupin metodou TNBS (lysin) [47]



Tabulka 17: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení volných aminoskupin kolagenových izolátů metodou TNBSA

	navážka					
	0,2 mg/ml	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,2 mg/ml	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml
vzorek kolagenu	$A_{335\text{ nm}}$			vypočtené množství aminoskupin (mg/ml)		
kuřecí	0,3345	0,3265	0,3320	0,003153	0,003050	0,003121
krůtí	0,3325	0,3235	0,3300	0,003127	0,003011	0,003095
hovězí	0,3850	0,3390	0,3375	0,003807	0,003212	0,003192
vepřový	0,3565	0,3290	0,3345	0,003438	0,003082	0,003153
rybí	0,3470	0,4170	0,3360	0,003315	0,004222	0,003173

Z vypočtených hodnot vyplývá, že všechny vzorky kolagenů obsahují přibližně stejné množství volných aminoskupin, a to dokonce i v preparátech o různých výchozích koncentracích. Není patrný trend klesajícího množství aminoskupin s klesající koncentrací kolagenu obsaženého v roztoku.

Z izolovaných preparátů obsahuje nejvyšší množství volných aminoskupin kolagen rybí. Tento údaj je významný zejména z hlediska případného využití kolagenu k přípravě síťovaných preparátů pro biomedicínké aplikace.

4.4.2 Sledování fyziologické stability kolagenových izolátů

Testování fyziologické stability bylo prováděno ve třech prostředích a při dvou různých teplotách, jak je popsáno v kapitole 3.5.2; změny kolagenu byly sledovány metodou biuretovou, TNBSA a PAGE-SDS (výsledky elektroforézy viz kapitola 4.5.6.)

4.4.2.1 Biuretová metoda

Kalibrace na standard hovězího kolagenu (Sigma) viz str. 58 *Graf 2*, postup přípravy vzorků a měření je uveden v kapitole 3.3.1.3.

Tabulka 18: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení obsahu peptidových vazeb kolagenů Biuretovou metodou během testování fyziologické stability

doba inkubace, teplota	vzorek kolagenu	A _{550 nm}			koncentrace peptidových vazeb (mg/ml)		
		fyziologický pufr	lidské sérum	kolagenáza	fyziologický pufr	lidské sérum	kolagenáza
ihned, 25 °C	kuřecí	0,110		0,038	1,350		0,391
	krůtí	0,066		0,056	0,764		0,631
	hovězí	0,104	–	0,142	1,270	–	1,776
	rybí	0,206		0,182	2,628		2,309
	vepřový	0,108		–	1,324		–
2 h, 25 °C	kuřecí	0,076	0,023	–	0,897	0,192	–
	krůtí	0,062		0,059	0,711		0,671
	hovězí	0,075		–	0,884		–
	rybí	0,114	–	–	1,403	–	–
	vepřový	0,133		0,070	1,656		0,818
2 h, 37 °C	kuřecí	0,068	0,214	0,081	0,791	2,735	0,964
	krůtí	0,089	0,131	0,142	1,071	1,630	1,776
	hovězí	0,067	–	–	0,778	–	–
	rybí	0,215	0,029	0,100	2,748	0,272	1,217
	vepřový	0,146	0,049	0,307	1,830	0,538	3,973
7 h, 25 °C	kuřecí	0,059		0,674	0,671		8,860
	hovězí	0,054	–	0,617	0,605	–	8,101
	rybí	0,080		0,645	0,951		8,474
7 h, 37 °C	kuřecí	0,062		0,598	0,711		7,848
	hovězí	0,065	–	0,625	0,751	–	8,208
	rybí	0,169		0,610	2,136		8,008
24 h, 25 °C	kuřecí	0,006	0,036	0,213	0	0,365	2,722
	krůtí	–	x	x	–	x	x
	hovězí	–	0,113	0,093	–	1,390	1,124
	rybí	0,107	x	x	1,310	x	x
24 h, 37 °C	kuřecí	–	0,110	0,177	–	1,350	2,242
	krůtí	0,002	–	0,562	0	–	7,369
	hovězí	0,046	0,030	0,198	0,498	0,285	2,522
	rybí	0,247	0,139	0,208	3,174	1,736	2,655
	vepřový	0,152	0,047	0,294	1,909	0,511	3,800
	kuřecí	0,013	–	0,458	0,059	–	5,984

48 h, 25 °C	kuřecí	0,013		0,458	0,059		5,984
	krůtí	0,003		0,571	0		7,489
	hovězí	0,012	–	0,405	0,045	–	5,278
	rybí	0,129		0,517	1,603		6,770
	vepřový	0,056		0,488	0,631		6,383
48 h, 37 °C	kuřecí	–	–	0,398	–	–	5,185
	krůtí	–	–	0,501	–	–	6,557
	hovězí	0,005	–	0,247	0	–	3,174
	rybí	0,209	0,148	0,337	2,668	1,856	4,373
	vepřový	0,139	0,074	0,362	1,736	0,871	4,706

Pozn.: – značí záporné hodnoty absorbance, x značí vynechání vzorku z důvodu nedostatku materiálu.

Měření koncentrace peptidových vazeb touto metodou bylo značně ovlivněno nehomogenitou vzorků (tzn. záleželo, zda bylo napipetováno více či méně kousků pevného kolagenu ve stejném objemu), a to především u rybího a vepřového kolagenu ve fyziologickém pufru a v lidském séru, kde se tvořila suspenze drobných částic, které plavaly v objemu. Inkubace v séru a kolagenáze byly obtížně hodnotitelné i s ohledem na přítomnost dalších proteinů v roztoku.

Pokud jde o základní stabilitu různých druhů kolagenu ve fyziologickém pufru, má na tento parametr vliv typ kolagenu a teplota inkubace. Jako nejstabilnější se jeví kolagen rybí při 37 °C, který si zachovává po dobu 48 hodin původní obsah peptidových vazeb. Stejný kolagen při 25 °C ztrácí již za 2 hodiny asi 50 % původní aktivity, avšak dále se úbytek peptidových vazeb nemění. Kuřecí kolagen je rovněž stabilnější při 37 °C, avšak úbytek peptidových vazeb za 2 hod je při 37 °C kolem 20 % a za 48 hod cca 70 % původní hodnoty. Krůtí kolagen je nejméně stabilní ze všech izolovaných preparátů, do 24 hod dochází k jeho úplné degradaci. Stabilita vepřového kolagenu je rovněž vyšší při 37 °C.

4.4.2.2 Metoda TNBSA

Kalibrace na standardní aminokyselinu lysin viz *Graf 3*, str. 63, postup přípravy vzorků a měření je uveden v kapitole 3.3.3.3.

Tabulka 19: Naměřené a vypočtené hodnoty při stanovení obsahu volných aminoskupin kolagenů metodou TNBSA během testování fyziologické stability

dobu inkubace, teplota	vzorek kolagenu	A _{335 nm}		koncentrace aminoskupin (mg/ml)	
		fyziologický pufr	kolagenáza	fyziologický pufr	kolagenáza
ihned, 25 °C	kuřecí	0,384	2,158	0,0038	0,0268
	krůtí	0,432	2,186	0,0044	0,0271
	hovězí	0,422	2,388	0,0043	0,0297
	rybí	0,575	2,406	0,0063	0,0300
	vepřový	0,410	2,439	0,0041	0,0304
2 h, 25 °C	kuřecí	0,406	2,464	0,0041	0,0307
	krůtí	0,391	2,495	0,0039	0,0311
	hovězí	0,553	2,370	0,006	0,0295
	rybí	0,694	2,384	0,0078	0,0297

	vepřový	0,598	2,595	0,0066	0,0324
2 h, 37 °C	kuřecí	0,449	2,447	0,0046	0,0305
	krůtí	0,433	2,500	0,0044	0,0312
	hovězí	0,556	2,365	0,006	0,0294
	rybí	0,602	2,433	0,0066	0,0303
	vepřový	0,745	2,496	0,0085	0,0311
7 h, 25 °C	kuřecí	0,468	2,483	0,0049	0,031
	hovězí	0,505	2,476	0,0054	0,0309
	rybí	0,572	2,483	0,0062	0,031
7 h, 37 °C	kuřecí	0,438	2,484	0,0045	0,031
	hovězí	0,505	2,475	0,0054	0,0309
	rybí	0,626	2,484	0,0069	0,031
24 h, 25 °C	kuřecí	0,588	2,324	0,0064	0,0289
	krůtí	0,643	x	0,0071	x
	hovězí	0,922	2,122	0,0108	0,0263
	rybí	0,604	x	0,0066	x
24 h, 37 °C	kuřecí	0,630	2,333	0,007	0,029
	krůtí	0,540	2,474	0,0058	0,0309
	hovězí	0,879	2,381	0,0102	0,0297
	rybí	0,658	2,391	0,0073	0,0298
	vepřový	0,747	2,483	0,0085	0,031
48 h, 25 °C	kuřecí	0,710	2,485	0,008	0,031
	krůtí	0,779	2,477	0,0089	0,0309
	hovězí	1,015	2,487	0,012	0,031
	rybí	0,813	2,482	0,0093	0,031
	vepřový	0,981	2,480	0,0115	0,0309
48 h, 37 °C	kuřecí	0,627	2,477	0,0069	0,0309
	krůtí	0,841	2,481	0,0097	0,031
	hovězí	1,096	2,471	0,013	0,0308
	rybí	1,107	2,475	0,0132	0,0309
	vepřový	0,843	2,463	0,0097	0,0307

Pozn.: x značí vynechání vzorku z důvodu nedostatku materiálu.

Z vizuálního hodnocení kolagenových vzorků podrobených testování fyziologické stability vyplývá, že již po dvou hodinách inkubace kolagenů v roztoku kolagenázy došlo k částečnému rozpuštění kolagenu hovězího, rybího i vepřového. Kuřecí a krůtí kolagen se pouze rozpadl na menší kousky. Během další inkubace enzym rozpustil veškerý hovězí, rybí i vepřový kolagen (čiré, díky enzymu hnědé, roztoky), u kuřecího a krůtího kolagenu ještě na konci inkubace minimální kousky plavaly v roztoku nerozpuštěny.

V čistém fyziologickém pufru došlo pouze k rozpadu rybího a částečně i vepřového kolagenu (již po dvou hodinách a suspenze zůstala již ve stejném stavu až do konce testování), hovězí kolagen nabobtnal, zbělal a částečně se rozvolnil až po 24 hodinové inkubaci, kuřecí a krůtí vzorky zůstaly vizuálně zcela nenarušeny i po 48 hodinách.

Vše co bylo konstatováno o kolagenech ve fyziologickém pufru, stejně platí i v lidském séru s výjimkou kuřecího kolagenu, který se vizuálně zdál trochu více narušen (po 24 hodinách). Vzorky kolagenů testované v lidském séru nemohly být měřeny metodou TNBSA, z důvodu tvorby sraženiny po přidání SDS a HCl ke vzorkům.

4.5 Elektroforetická analýza kolagenů metodou PAGE-SDS

Elektroforetické stanovení kolagenů bylo nutné optimalizovat zejména z hlediska hustoty používaného polyakrylamidového gelu, podmínek separace (napětí, proud, čas), ale i přípravy vzorků (často obtížně rozpustitelné, nutnost úpravy pH) a jejich množství nanášeného na gel.

Všechny gely byly připravovány postupem uvedeným v kapitole 3.4.1.2. Nejprve byly vzorky nanášeny na 10% gel, poté byla hustota gelu postupně snižována (hustota gelů a jejich složení viz *Tabulka 10*). Po separaci byly gely barveny barvivem Comassie Brilliant Blue R-250 způsobem popsáným v kapitole 3.4.1.5.

K optimalizaci elektroforézy byly využity vzorky modifikovaných kolagenů, které byly upraveny na ÚCHM FCH VUT v Brně (viz *Tabulka 20*), vzorek rybího kolagenu – tenká fólie (Polsko), kolagenových standardů a dále byly pomocí PAGE-SDS charakterizovány kolageny izolované z pěti druhů živočišných tkání včetně testování jejich stability.

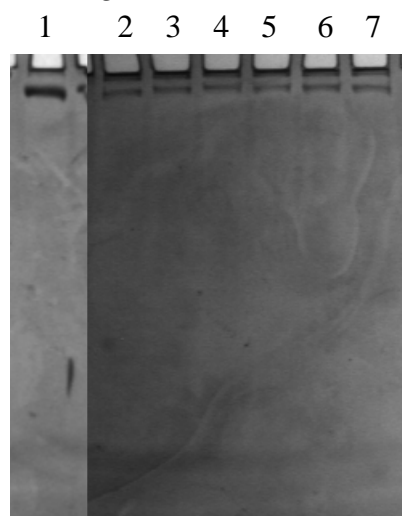
Tabulka 20: Seznam používaných modifikovaných kolagenních materiálů získaných z ÚCHM FCH VUT v Brně

Označení kolagenového vzorku	Popis
031108 A	surový lyofilizovaný kolagen
031108 B	lyofilizovaný kolagen po dezintegraci
031108 C	pasírovaný lyofilizovaný kolagen
141008 A1	roztok kolagenu ve vodě při 23 °C
141008 B1	roztok kolagenu v kys. octové při 23 °C
141008 C1	roztok kolagenu v kys. mravenčí při 23 °C
161008 A1	roztok kolagenu ve vodě při 4 °C
161008 B1	roztok kolagenu v kys. octové při 4 °C
161008 C1	roztok kolagenu v kys. mravenčí při 4 °C
atelokolagen	lyofilizovaný rozpustný kolagen
040309 2/B2	lyofilizovaný kolagen po dezintegraci (1 min)
040309 2/B6	lyofilizovaný kolagen po dezintegraci (3 min)
surový	hovězí surový (neupravovaný) kolagen z průmyslu (z 8% roztoku)

4.5.1 Elektroforetická analýza kolagenových standardů, modifikovaných kolagenů a proteinových směsí na 10% gelech

V první fázi bylo optimalizováno množství (koncentrace) přidávaného iniciačního činidla (APS) do 10% gelu, které ovlivňuje jeho hustotu, a dále byly otestovány proteinové směsi 4, 5, 6 jako standardní bílkoviny se známou molekulovou hmotností k odhadu molekulové hmotnosti kolagenů.

Obr. 20: Elektroforéza kolagenového standardu a vzorků roztoků z ÚCHM FCH VUT v Brně – 10% gel



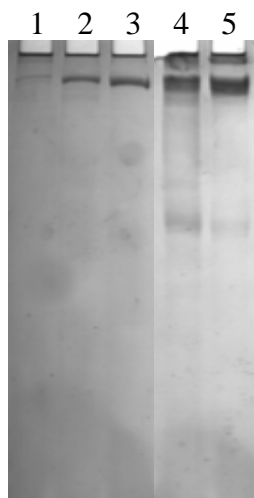
Tabulka 21: Popis k Obr. 20

číslo jamky	vzorek
1	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
2	roztok kolagenu v kys. mravenčí při 4 °C (ÚCHM)
3	vzorek kolagenu v kys. octové při 4 °C (ÚCHM)
4	vzorek kolagenu ve vodě při 4 °C (ÚCHM)
5	vzorek kolagenu v kys. mravenčí při 23 °C (ÚCHM)
6	vzorek kolagenu v kys. octové při 23 °C (ÚCHM)
7	vzorek kolagenu ve vodě při 23 °C (ÚCHM)

Dělení probíhalo 3 hodiny při 90 V a 130 mA, všechny vzorky byly nanесeny v množství 15 μ l.

Na přípravu gelu bylo použito iniciační činidlo (APS) ve velmi vysoké koncentraci a tudíž gel „fixoval“ všechny vzorky v téměř stejné poloze na počátku gelu. Tento gel byl již na pohled tuhý, málo flexibilní, proto bylo dále APS pro každou separaci přesně naváženo a rozpuštěno v redestilované vodě (100 mg/ml).

Obr. 21: Elektroforéza kolagenových standardů a vzorku roztoku z ÚCHM FCH VUT v Brně – 10% gel

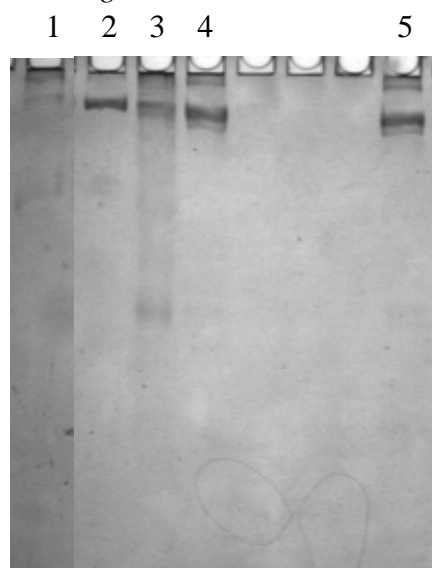


Tabulka 22: Popis k Obr. 21

číslo jamky	vzorek
1	vzorek kolagenu rozp.v kys. octové při 23 °C (ÚCHM)
2	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
3	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml – zalkalizovaný vzorek
4	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
5	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin – zalkalizovaný vzorek

Separace probíhala 3 hodiny, 30 minut při 90 V a 120 mA, nanášky 15 µl.

Obr. 22: Elektroforéza kolagenových standardů a vzorku roztoku z ÚCHM FCH VUT v Brně – 10% gel

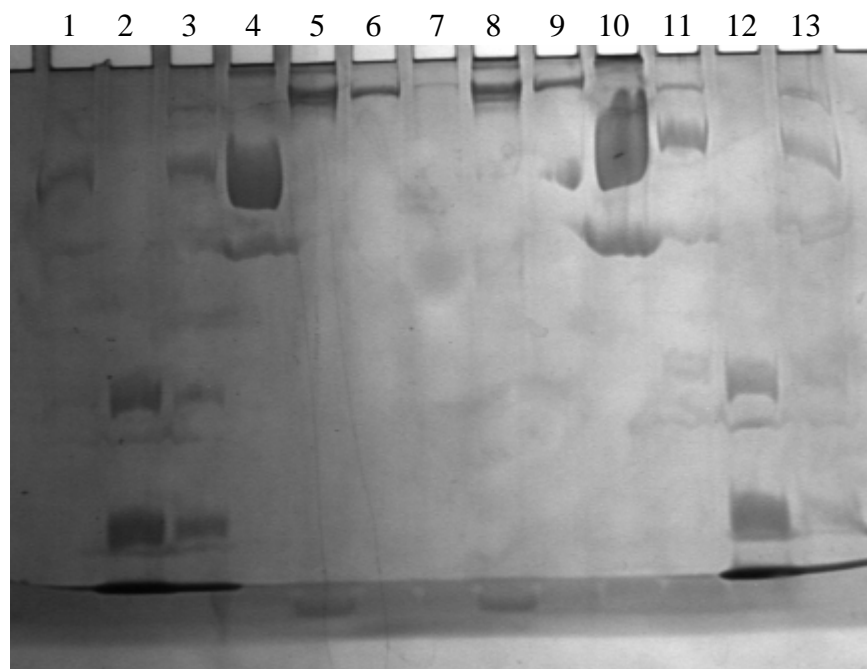


Tabulka 23: Popis k Obr. 22

číslo jamky	vzorek
1	vzorek kolagenu rozp.v kys. octové při 23 °C (ÚCHM)
2	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
3	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
4, 5	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin – zalkalizovaný vzorek

Separace 4 hodiny, 90 V, 120 mA, nanášky 15 µl.

Obr. 23: Elektroforéza proteinových směsí, kolagenových standardů a vzorku roztoku z ÚCHM FCH VUT v Brně – 10% gel



Tabulka 24: Popis k Obr. 23

číslo jamky	vzorek
1	proteinová směs 4 6 mg/ml
2	proteinová směs 5
3	proteinová směs 6 10 mg/ml
4	hovězí albumin
5	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin – zalkalizovaný vzorek
6	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml – zalkalizovaný vzorek
7	vzorek kolagenu rozp.v kys. octové při 23 °C (ÚCHM)
8	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin – zalkalizovaný vzorek
9	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml – zalkalizovaný vzorek
10	hovězí albumin
11	proteinová směs 4 6 mg/ml
12	proteinová směs 5
13	proteinová směs 6 10 mg/ml

Dělení probíhalo 3 h, při 90 V, 120 mA, nanášky: jamky 1 – 4 10 µl, ostatní 15 µl.

Tabulka 25: Složení proteinových směsí a molekulové hmotnosti

Standard	Bílkovina	Molekulová hmotnost (Da)
proteinová směs 4	fosforyláza B	97 400
	hovězí albumin	67 000
	vaječný albumin	45 000
	karboanhydráza	29 000
proteinová směs 5	karboanhydráza	29 000
	sójový trypsin inhibitor	21 000
	cytochrom C	12 500

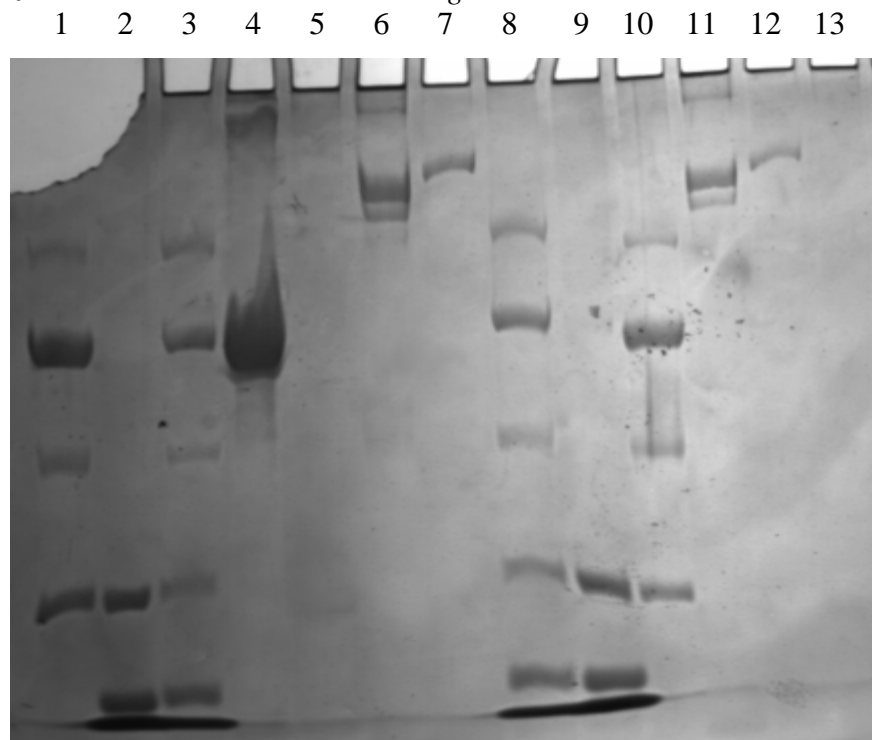
	hovězí trypsin inhibitor	6 500
proteinová směs 6	fosforyláza B	97 400
	hovězí albumin	67 000
	vaječný albumin	45 000
	karboanhydráza	29 000
	sójový trypsin inhibitor	21 000
	cytochrom C	12 500
	hovězí trypsin inhibitor	6 500

Výsledky uvedené na *Obr. 21 – Obr. 23* byly pořízeny na 10% gelu, který se ukázal jako příliš hustý pro separaci kolagenu. Tato skutečnost byla ověřena pomocí standardních směsí, jejichž největší složka o molekulové hmotnosti 97 kDa nebyla příliš vzdálena od startu. S ohledem na předpokládanou velikost molekul kolagenu bylo nutné modifikovat hustotu gelu.

4.5.2 Modifikace hustoty polyakrylamidového gelu

V další části optimalizace elektroforetického stanovení kolagenů byly testovány nižší hustoty polyakrylamidového gelu spolu s přizpůsobením délky a podmínek separace pro dělení velkých proteinů.

Obr. 24: Elektroforéza proteinových směsí, kolagenových standardů a vzorku roztoku z ÚCHM FCH VUT v Brně – 8 % gel



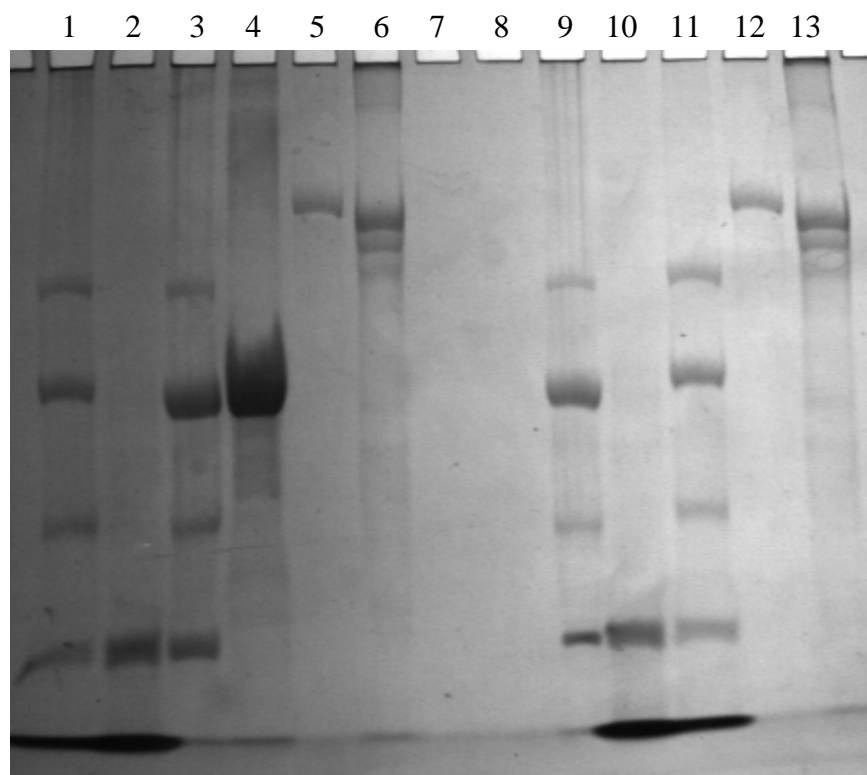
Tabulka 26: Popis k Obr. 24

číslo jamky	vzorek
1	proteinová směs 4 6 mg/ml
2	proteinová směs 5
3	proteinová směs 6 10 mg/ml
4	hovězí albumin

5	vzorek kolagenu rozp.v kys. octové při 23 °C (ÚCHM)
6	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
7	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
8	proteinová směs 6 10 mg/ml
9	proteinová směs 5
10	proteinová směs 4 6 mg/ml
11	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
12	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
13	vzorek kolagenu rozp.v kys. octové při 23 °C (ÚCHM)

Separace probíhala 3 hodiny, 30 minut při 90 V a 120 mA, nanášky: jamky 5 - 7 15 μ l, ostatní 10 μ l.

Obr. 25: Elektroforéza proteinových směsí, kolagenních standardů a pevného vzorku atelokolagenu z ÚCHM FCH VUT v Brně – 7 % gel



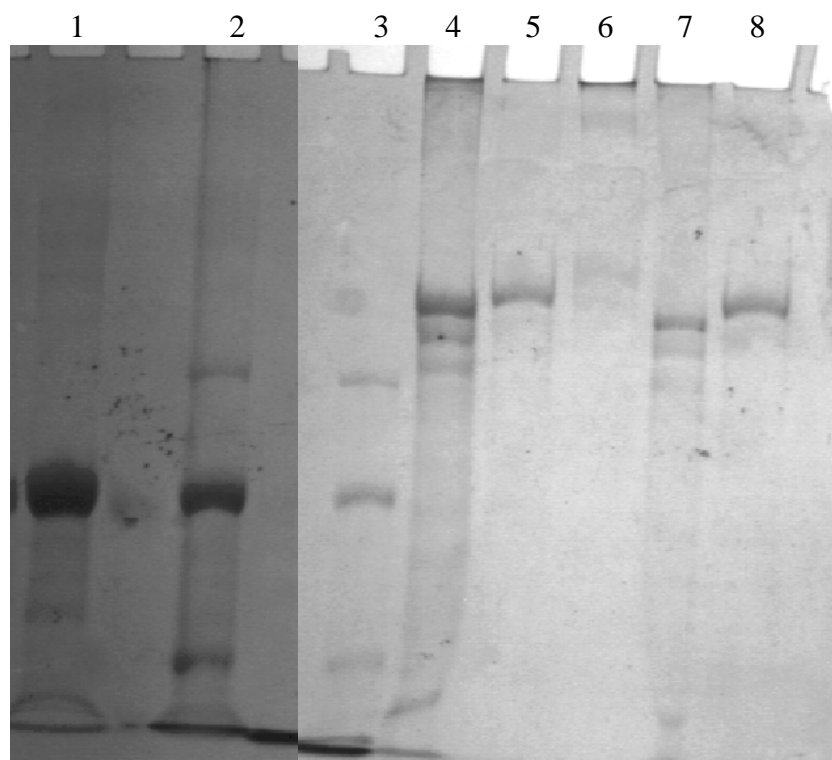
Tabulka 27: Popis k Obr. 25

číslo jamky	vzorek
1	proteinová směs 6 10 mg/ml
2	proteinová směs 5
3	proteinová směs 4 6 mg/ml
4	hovězí albumin
5	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
6	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
7	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml – zalkalizovaný vzorek
8	vzorek rozp. atelokolagenu (ÚCHM) 1 mg/ml
9	proteinová směs 4 6 mg/ml
10	proteinová směs 5

11	proteinová směs 6 10 mg/ml
12	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
13	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin

Separace probíhala 4 hodiny při 90 V, 120 mA, nanášky: proteinové směsi + albumin 10 μ l, ostatní 15 μ l.

Obr. 26: Elektroforéza proteinových směsí, kolagenních standardů a vzorku roztoku z ÚCHM FCH VUT v Brně – 6% gel



Tabulka 28: Popis k Obr. 26

číslo jamky	vzorek
1	hovězí albumin
2	proteinová směs 4 6 mg/ml
3	proteinová směs 6 10 mg/ml
4	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
5	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
6	vzorek kolagenu rozp.ve vodě při 4 °C (ÚCHM)
7	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
8	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml

Dělení probíhalo 4 hodiny, při 70 V, 100 mA, nanášky: proteinové směsi + albumin 10 μ l, ostatní 15 μ l.

Hustota gelu byla snížena na 8 % a poté 7 % a 6 %. Už u 8% gelu je viditelné zlepšení výsledku separace, u 7% gelu je patrné, že došlo k velmi uspokojivému dělení skupiny standardních proteinů o vyšší molekulové hmotnosti (proteinová směs 4) a rovněž standardních vzorků kolagenu. Jasně patrná je odlišná struktura standardního kolagenu

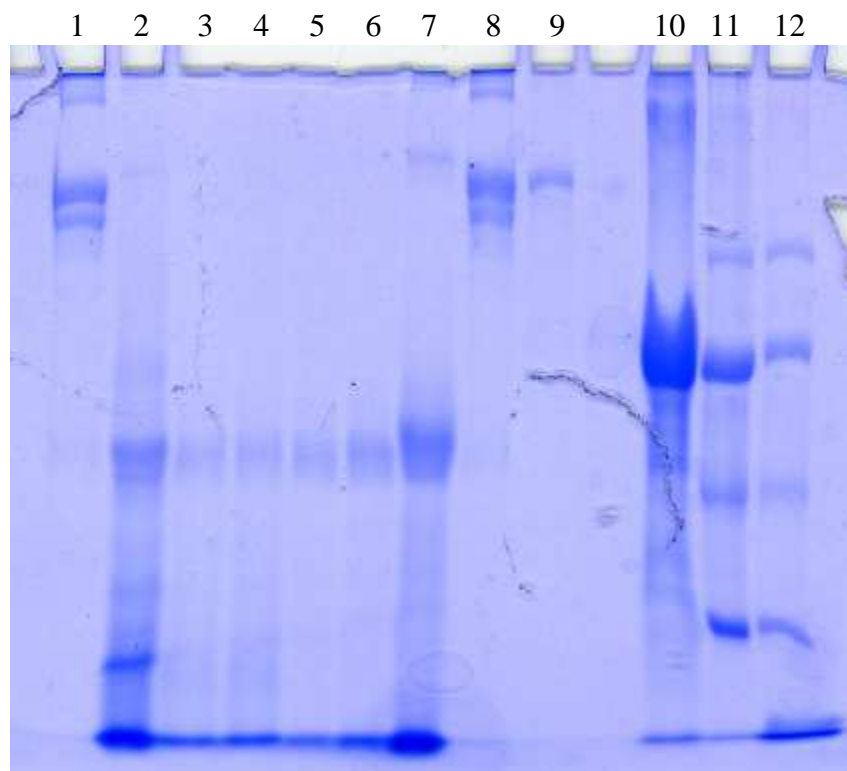
z kuřecích přepážek (kolagen II) a podjednotkové složení standardního bovinního kolagenu. Ve vzorcích s přidavkem kolagenu je patrná příslušná zóna. U následující separace na 6% gelu bylo sníženo napětí, ovšem vzhledem k nízké hustotě byla již ztížena manipulace s gelem při barvení.

Dle uvedených výsledků testování hustoty polyakrylamidového gelu k separaci kolagenů byla po finálním testování jako optimální hustota vybrána 7,5 %, při které byly realizovány veškeré další experimenty. Tato koncentrace gelu je používána i v některých pracích [27].

4.5.3 Testování rozpustnosti modifikovaných kolagenových materiálů

Modifikované kolagenové materiály upravované na ÚCHM FCH VUT v Brně byly k dispozici většinou v lyofilizované formě a bylo třeba je pro analýzu rozpustit. Rozpouštění probíhalo v kyselině octové (koncentrace 0,1 – 0,5 M), popř. s přidavkem pepsinu, který má teplotní optimum 37 °C, a proto byly vzorky během rozpouštění inkubovány při této teplotě na vodní lázni. Pro srovnání bylo rozpouštění realizováno také při 4 °C v lednici.

Obr. 27: Elektroforéza proteinových směsí, kolagenních standardů a vzorků modifikovaných kolagenů z ÚCHM FCH VUT v Brně s pepsinem při 37 °C – 7,5% gel



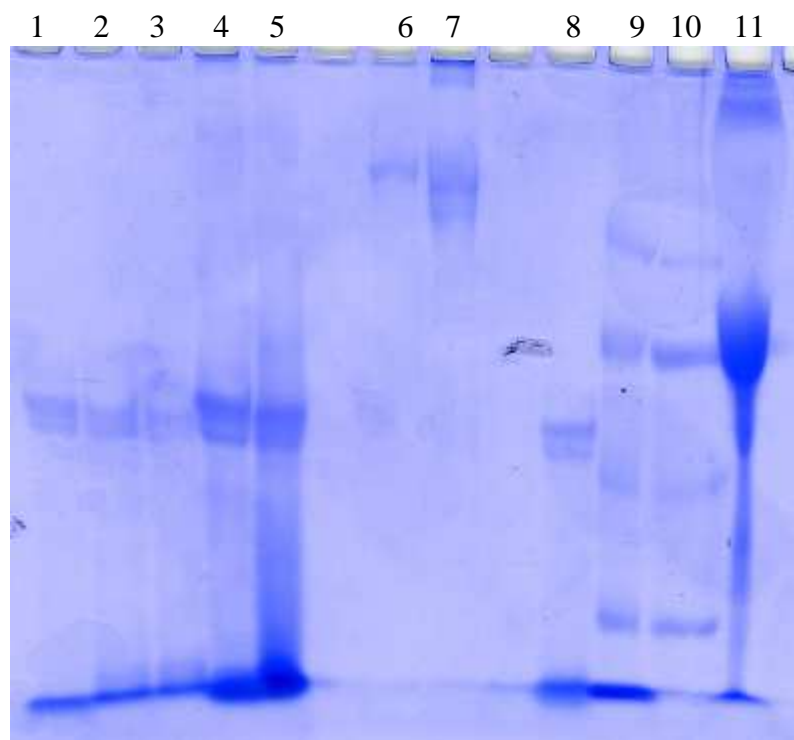
Tabulka 29: Popis k Obr. 27

číslo jamky	vzorek
1	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
2	surový hovězí kolagen z průmyslu + pepsin (ÚCHM)
3	2/B6 dezintegr. kolagenní lyofilizát (3 min) + pepsin (ÚCHM)
4	2/B2 dezintegr. kolagenní lyofilizát (1 min) + pepsin (ÚCHM)
5	lyofil. kolagen pasírovaný + pepsin (ÚCHM)
6	lyofil. kolagen dezintegrováný + pepsin (ÚCHM)

7	lyofil. kolagen surový + pepsin (ÚCHM)
8	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
9	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
10	hovězí albumin
11	proteinová směs 4 6 mg/ml
12	proteinová směs 6 10 mg/ml

Separace probíhala 4 hodiny při 90 V, 120 mA, nanášky: proteinové směsi + albumin 10 μ l, ostatní vzorky 15 μ l.

Obr. 28: Elektroforéza proteinových směsí, kolagenních standardů a vzorků modifikovaných kolagenů z ÚCHM FCH VUT v Brně s pepsinem při 37 °C – 7,5% gel

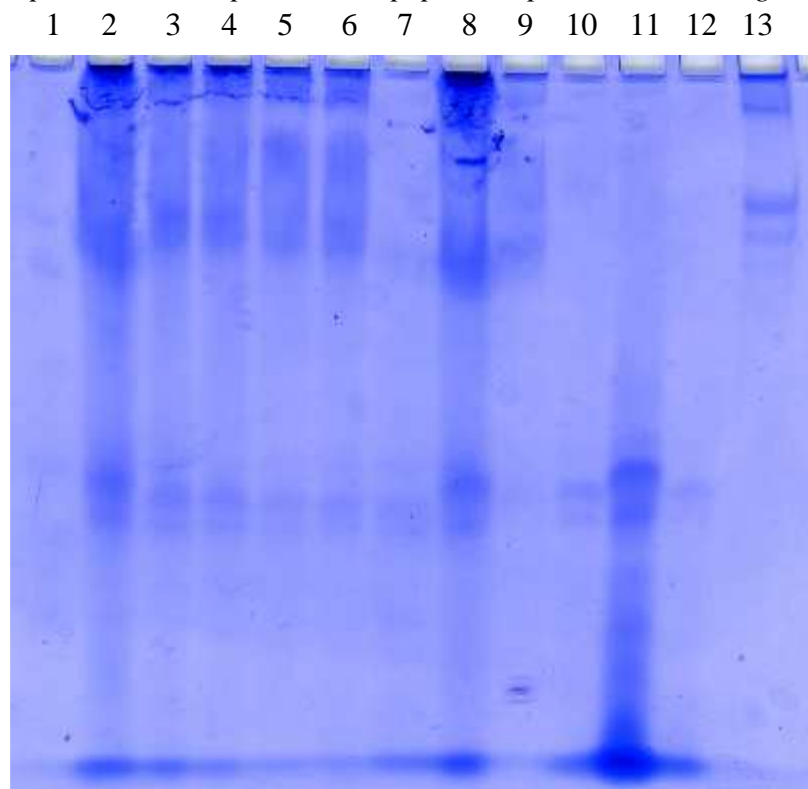


Tabulka 30: Popis k Obr. 28

číslo jamky	vzorek
1	lyofil. kolagen dezintegrovaný + pepsin (ÚCHM)
2	2/B6 dezintegr. kolagenní lyofilizát (3 min) + pepsin (ÚCHM)
3	2/B2 dezintegr. kolagenní lyofilizát (1 min) + pepsin (ÚCHM)
4	lyofil. kolagen surový + pepsin (ÚCHM)
5	surový hovězí kolagen z průmyslu + pepsin (ÚCHM)
6	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
7	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
8	vzorek rozp. atelokolagenu 1 mg/ml + pepsin (ÚCHM)
9	proteinová směs 6 10 mg/ml
10	proteinová směs 4 6 mg/ml
11	hovězí albumin

Dělení probíhala 4 hodiny při 90 V, 120 mA, nanášky: proteinové směsi + albumin 10 μ l, ostatní vzorky 15 μ l.

Obr. 29: Elektroforéza vysokomolekulárního bílkovinného standardu, kolagenových standardů, vzorků modifikovaných kolagenů z ÚCHM FCH VUT v Brně s pepsinem při 4 °C v porovnání s rozpouštěním s pepsinem při 37 °C – 7,5% gel



Tabulka 31: Popis k Obr. 29

číslo jamky	vzorek
1	vysokomolekulární bílkovinný standard
2	lyofil. kolagen surový + pepsin 4 °C (ÚCHM)
3	lyofil. kolagen dezintegrováný + pepsin 4 °C (ÚCHM)
4	lyofil. kolagen pasírovaný + pepsin 4 °C (ÚCHM)
5	2/B2 dezintegr. kolagenní lyofilizát (1 min) + pepsin 4 °C (ÚCHM)
6	2/B6 dezintegr. kolagenní lyofilizát (3 min) + pepsin 4 °C (ÚCHM)
7	vzorek rozp. atelokolagenu 1 mg/ml + pepsin 4 °C (ÚCHM)
8	surový hovězí kolagen z průmyslu + pepsin 4 °C (ÚCHM)
9	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
10	lyofil. kolagen pasírovaný + pepsin 37 °C (ÚCHM)
11	surový hovězí kolagen z průmyslu + pepsin 37 °C (ÚCHM)
12	2/B2 dezintegr. kolagenní lyofilizát (1 min) + pepsin 37 °C (ÚCHM)
13	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)

Separace probíhala 4 hodiny, 20 minut při 90 V, 120 mA, nanášky 15 µl s výjimkou vysokomolekulárního bílkovinného standardu (10 µl).

Tabulka 32: Složení a molekulové hmotnosti vysokomolekulárního bílkovinného standardu (Sigma)

Bílkovina	Molekulární hmotnost (Da)
myosin (králičí sval)	200 000

β -galaktozidáza (E. coli)	116 000
fosforyláza b (králíčí sval)	97 000
hovězí sérový albumin	66 000
glutamátdehydrogenáza (hovězí játra)	55 000
vaječný albumin (kuřecí vejce)	45 000
glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (králíčí sval)	36 000

U vzorků rozpuštěných při 37 °C (viz *Obr. 27 – Obr. 29*) jsou viditelné fragmenty s evidentně nižší molekulovou hmotností, než mají kolagenové standardy, které zahřívány nebyly. S velkou pravděpodobností jde o bandy pepsinu, který byl na rozpouštění použit. Jelikož k analýze byl odebrán pouze roztok nad kolagenem, je možné, že při nedokonalém rozpuštění byla koncentrace kolagenu v nanášeném vzorku tak nízká, že jej nebylo možné detekovat. Tuto domněnku naznačuje i fakt, že se po určité době z roztoku oddělila sraženina na dně. Pro potvrzení byl elektroforeticky analyzován čistý pepsin ve třech různých koncentracích (viz *Obr. 31*), kde byla odhadnuta jeho molekulární hmotnost asi na 45 – 55 kDa. Diskutované fragmenty této velikosti přibližně odpovídají.

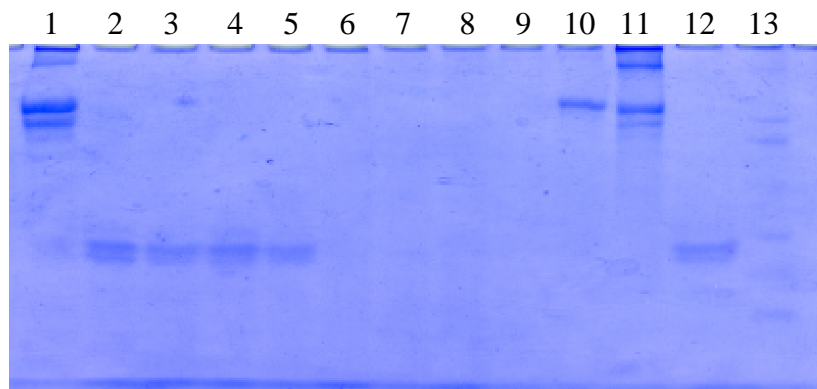
Z důvodu vysoké molekulární hmotnosti kolagenu bylo zavedeno používání vysokomolekulárního bílkovinného standardu (Sigma) s distribucí molekulárních hmotností od 36 000 do 205 000 Da. Z výsledků uvedených na *Obr. 29* je patrné, že při použití pepsinu a důkladném rozpuštění kolagenu v optimálním pH jsou dobře patrné u všech analyzovaných modifikovaných vzorků bandy kolem cca 300 kDa odpovídající celé molekule kolagenu a současně podjednotky o velikosti cca 120 – 140 kDa odpovídající příslušným alfa- a beta-podjednotkám kolagenu (viz str. 33, *Obr. 3*).

4.5.4 Analýza izolovaných kolagenů metodou PAGE-SDS

Zavedení používání vysokomolekulárního bílkovinného standardu (Sigma) si vynutilo optimalizovat způsob jeho ředění. Při naředění dle pokynů výrobce (100 μ l redestilované vody) byly fragmenty standardu velmi slabě viditelné (viz *Obr. 29*, jamka číslo 1).

Po úpravě koncentrace standardu (viz *Obr. 31*) byly dobře viditelné všechny jeho složky od 200 kDa do 36 kDa. Současně bylo na gelech možné dobře hodnotit a srovnávat jednotlivé izolované kolagenové preparáty.

Obr. 30: Elektroforéza vysokomolekulárního bílkovinného standardu, kolagenních standardů a vzorků z prvního pokusu izolace kolagenu z živočišných tkání – 7,5% gel



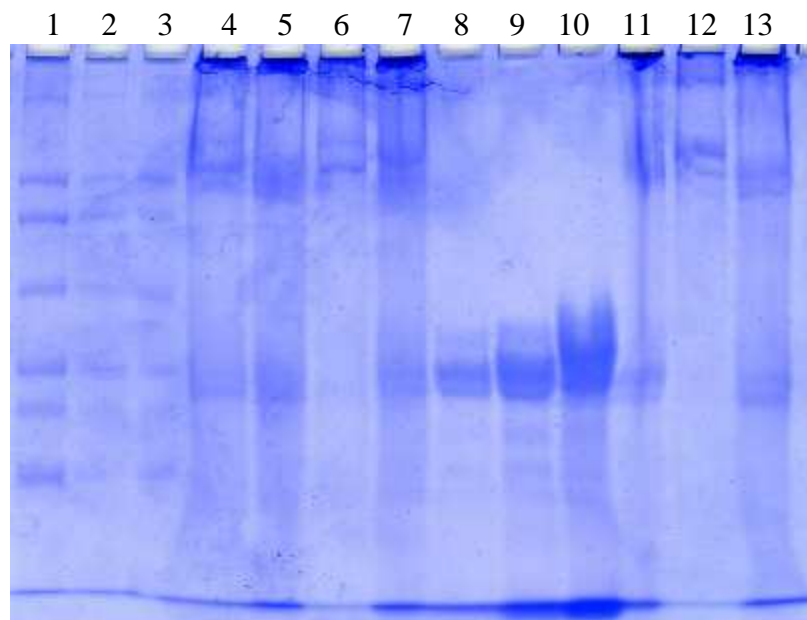
Tabulka 33: Popis k Obr. 30

číslo jamky	vzorek
1	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
2	izolace – kuřecí (rozmix.) + pepsin
3	izolace – krůtí (rozmix.) + pepsin
4	izolace – kuřecí (kousky) + pepsin
5	izolace – krůtí (kousky) + pepsin
6	non-kolagenní proteiny po alk. hydrolýze – kuřecí 1. podíl
7	non-kolagenní proteiny po alk. hydrolýze – kuřecí 2. podíl
8	non-kolagenní proteiny po alk. hydrolýze – krůtí 1. podíl
9	non-kolagenní proteiny po alk. hydrolýze – krůtí 2. podíl
10	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
11	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)
12	izolace – kuřecí (rozmix.) + pepsin
13	vysokomolekulární bílkovinný standard

Separace probíhala 4 hodiny, 20 minut při 90 V, 120 mA, nanášky 15 µl s výjimkou vysokomolekulárního bílkovinného standardu (10 µl).

Výsledek na Obr. 30 dokládá, že první izolační pokus kolagenu nebyl úspěšný, v jednotlivých liniích byl viditelný zejména band pepsinu.

Obr. 31: Elektroforéza vzorků z druhé izolace kolagenu z živočišných tkání, optimalizace ředění vysokomolekulárního bílkovinného standardu a srovnání různých koncentrací pepsinu – 7,5% gel



Tabulka 34: Popis k Obr. 31

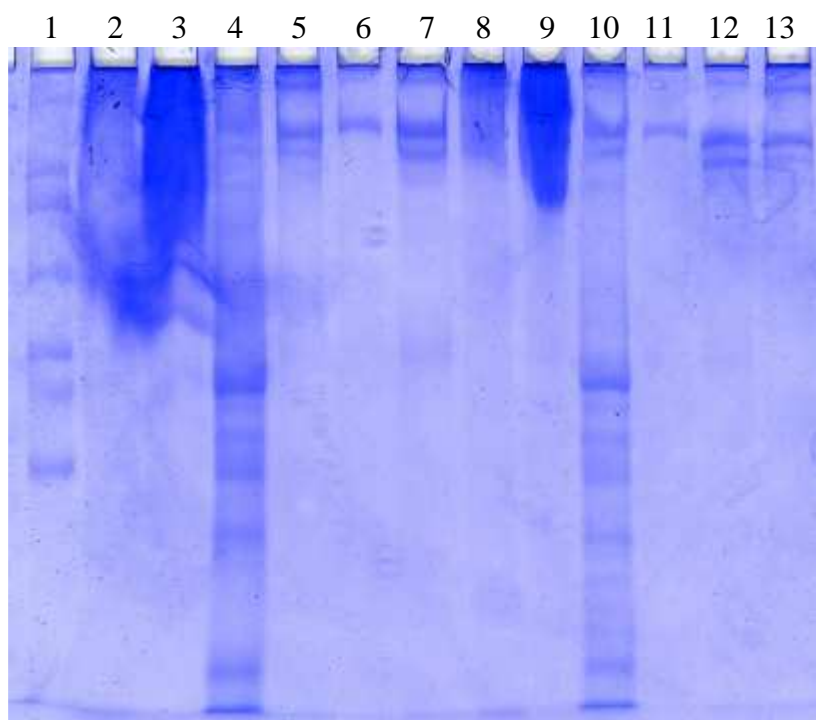
číslo jamky	vzorek
1	vysokomolekulární bílkovinný standard (nařed. 25 µl)
2	vysokomolekulární bílkovinný standard (nařed. 25 µl, poté 10 µl odebráno + přidáno 35 µl redest. H ₂ O)
3	vysokomolekulární bílkovinný standard (nařed. 100 µl – dle výrobce)

4	izolace – kuřecí (rozmix. 30 g) + pepsin
5	izolace – kuřecí (rozmix. 50 g) + pepsin
6	izolace – krůtí (rozmix. 30 g)
7	izolace – krůtí (rozmix. 50 g) + pepsin
8	pepsin (12 mg/0,2 ml)
9	pepsin (31 mg/0,2 ml)
10	pepsin (57 mg/0,2 ml)
11	surový hovězí kolagen z průmyslu + pepsin 4 °C (ÚCHM)
12	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)
13	izolace – kuřecí (rozmix. 50 g) + pepsin

Separace probíhala 4 hodiny a 20 minut, při 90 V a 120 mA, nanášky 15 µl s výjimkou vysokomolekulárního bílkovinného standardu (10 µl).

Z výsledků uvedených na *Obr. 31* je patrné, že všechny izolované preparáty kolagenu separované na tomto gelu i preparát rybího kolagenu z Polska patří do skupiny kolagenů typu I (viz kapitola 2.5, str. 31 a *Obr. 3*, str. 33).

Obr. 32: Elektroforéza vzorků z třetí izolace kolagenu z živočišných tkání – 7,5% gel



Tabulka 35: Popis k Obr. 32

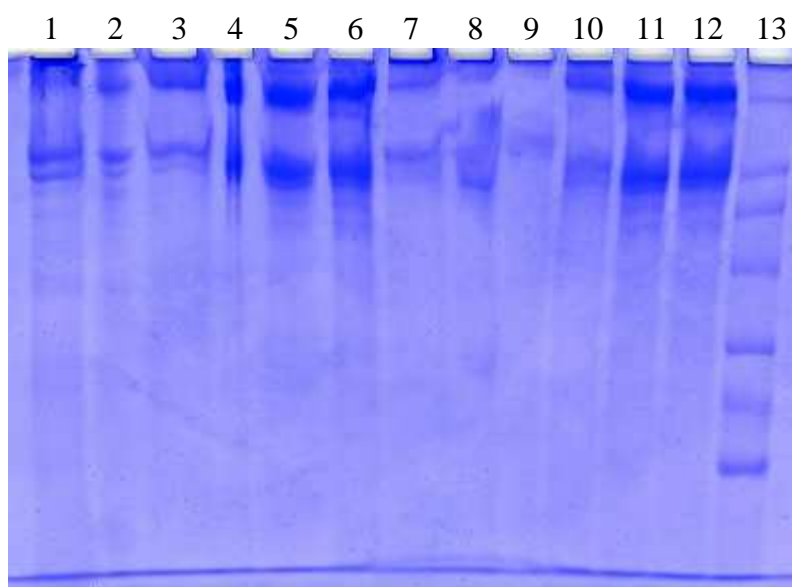
číslo jamky	vzorek
1	vysokomolekulární bílkovinný standard
2	izolace – vepř.
3	izolace - rybí
4	izolace – kuřecí prsní přepážky
5	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)
6	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
7	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
8	izolace – vepř.

9	izolace - rybí
10	izolace – kuřecí prsní přepážky
11	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
12	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
13	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)

Separace probíhala 4 hodiny při 90 V, 120 mA, nanášky: jamky 3 – 8 15 μ l, ostatní vzorky 10 μ l.

Z výsledků uvedených na Obr. 32 je patrné, že pouze preparát izolovaný z kuřecí prsní přepážky se významně odlišuje od ostatních typů izolátů; jednak nemá typické složení kolagenu I a také obsahuje řadu interferujících složek a nečistot.

Obr. 33: Elektroforéza naředěných vzorků kolagenů z třetí izolace – 7,5% gel



Tabulka 36: Popis k Obr. 33

číslo jamky	vzorek
1	izolace – vepř. (neřed. vzorek)
2	izolace – vepř. (nařed. 1 x)
3	izolace – vepř. (nařed. 2 x)
4	izolace – rybí (neřed. vzorek)
5	izolace – rybí (nařed. 1 x)
6	izolace – rybí (nařed. 2 x)
7	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)
8	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
9	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
10	izolace – vepř. (nařed. 2 x)
11	izolace – rybí (nařed. 2 x)
12	izolace – rybí (nařed. 2 x)
13	vysokomolekulární bílkovinný standard

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky: jamka č. 7 – 9 15 μ l, ostatní vzorky 10 μ l.

Jako nejvhodnější ředění vysokomolekulárního bílkovinného standardu se jeví naředění cca 34 μ l redestilované vody, tak aby jedna vialka standardu vyšla na tři nanášky po 10 μ l a separovaná směs bílkovin byla dobře na pozadí viditelná (viz *Obr. 31*, jamky č. 1 – 3).

V této části práce byly analyzovány vzorky izolovaných kolagenů z pěti různých živočišných tkání – kuřecí, krůtí, vepřové, rybí kůže a kuřecí prsní přepážky. Fragmenty všech izolátů z kůží odpovídaly standardům kolagenu, u kolagenu z hrudních přepážek je viditelných více fragmentů o různé molekulové hmotnosti, z čehož lze usoudit, že by byl vhodný ještě nějaký purifikační krok k získání čistého kolagenu typu II, který by se v přepážkách (chrupavkách) měl vyskytovat (viz *Tabulka 2*).

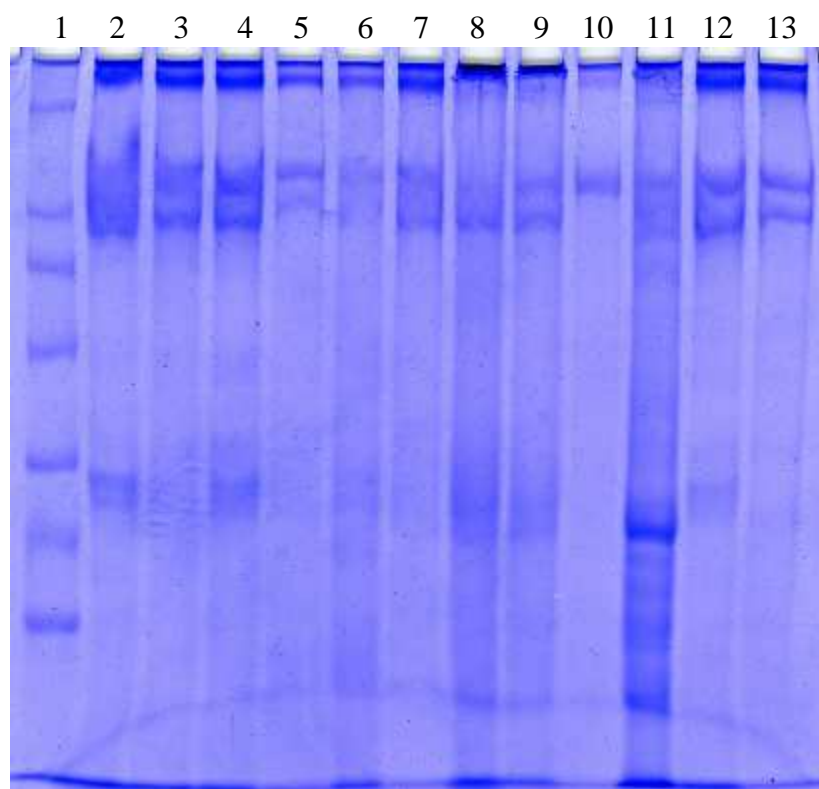
Dle výsledků na gelech lze konstatovat, že izolace byly úspěšné a podařilo se vyizolovat kuřecí, krůtí, vepřový i rybí kolagen typu I.

4.5.5 Sledování vlivu teploty na kolagenové izoláty

Jedním z testů stability izolovaných kolagenů byl test teplotní stability doplněný analýzou vzorků metodou PAGE-SDS. Vzorky byly zahřívány vždy po dobu 1 hodiny v rozmezí teplot od 25 °C do 90 °C (dle množství materiálu) v termobloku.

Z důvodu nedostatku materiálu k dalšímu testování byla provedena znovu izolace kolagenu z kuřecích a krůtích kůží a výsledný produkt byl ověřen na gelu (viz *Obr. 36*, jamky číslo 1, 2).

Obr. 34: Elektroforéza krůtích kolagenních vzorků po testování tepelné stability – 7,5% gel



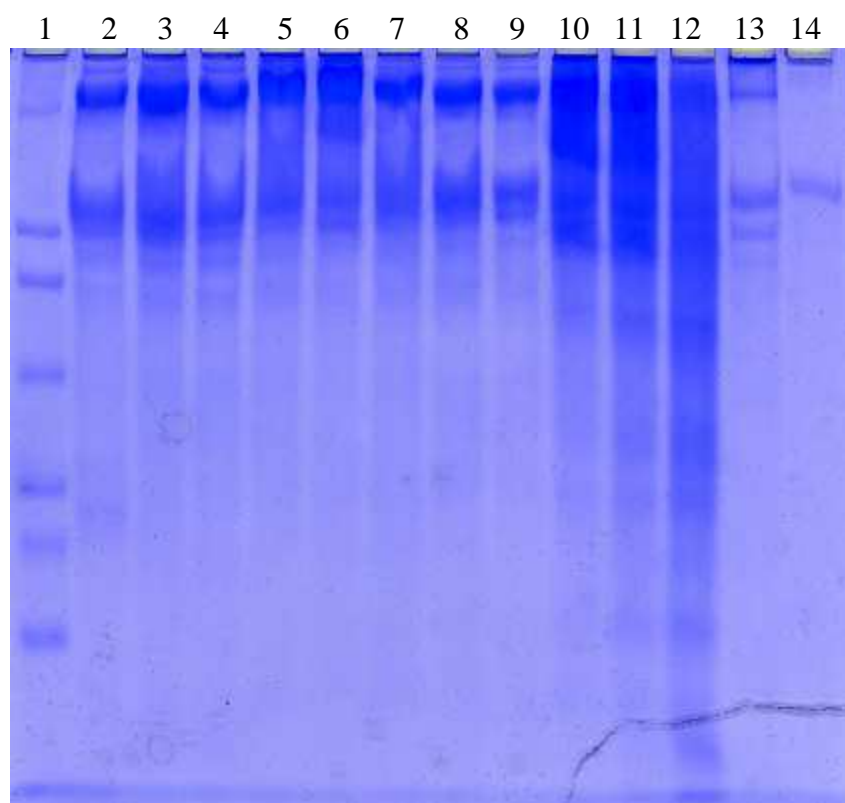
Tabulka 37: Popis k Obr. 34

číslo jamky	vzorek
1	vysokomolekulární bílkovinný standard

2	krůtí izolát – záhřev 25 °C + pepsin
3	krůtí izolát – záhřev 30 °C + pepsin
4	krůtí izolát – záhřev 35 °C + pepsin
5	krůtí izolát – záhřev 40 °C + pepsin
6	krůtí izolát – záhřev 50 °C + pepsin
7	krůtí izolát – záhřev 60 °C
8	izolace – krůtí (rozmix. 50 g) + pepsin
9	izolace – kuřecí (rozmix. 30 g) + pepsin
10	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml
11	izolace – kuřecí prsní přepážky
12	krůtí izolát – záhřev 35 °C + pepsin
13	krůtí izolát – záhřev 60 °C

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky: jamka č. 10 15 μ l, ostatní vzorky 10 μ l.

Obr. 35: Elektroforéza rybích kolagenních vzorků po testování tepelné stability – 7,5% gel



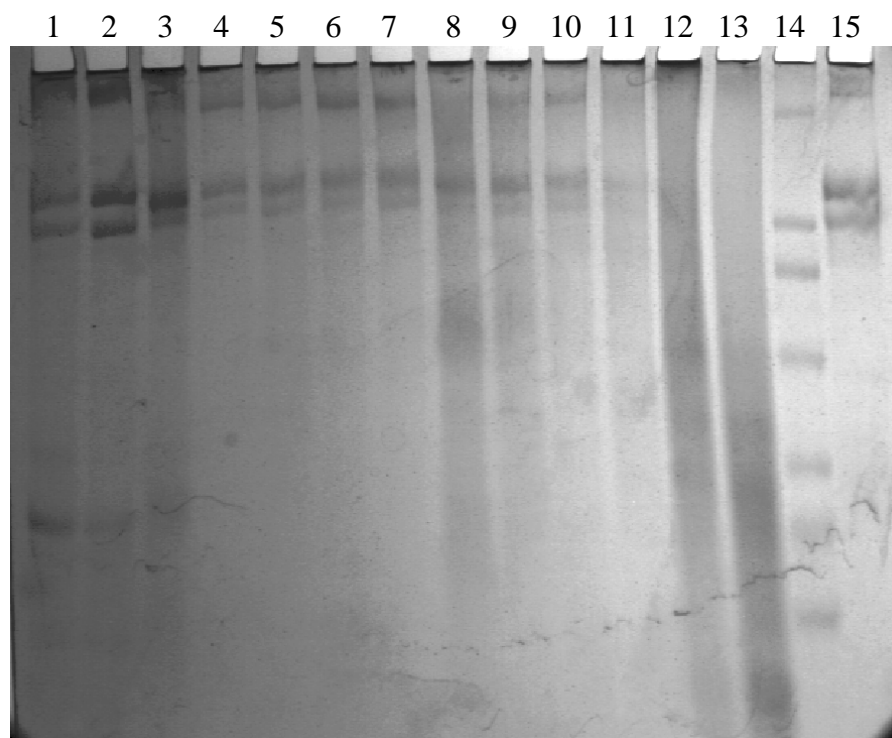
Tabulka 38: Popis k Obr. 35

číslo jamky	vzorek
1	vysokomolekulární bílkovinný standard
2	rybí izolát – záhřev 25 °C + pepsin
3	rybí izolát – záhřev 30 °C
4	rybí izolát – záhřev 35 °C
5	rybí izolát – záhřev 40 °C
6	rybí izolát – záhřev 45 °C
7	rybí izolát – záhřev 50 °C
8	rybí izolát – záhřev 55 °C

9	rybí izolát – záhřev 60 °C
10	rybí izolát – záhřev 70 °C
11	rybí izolát – záhřev 80 °C
12	rybí izolát – záhřev 90 °C
13	vzorek rybího kolagenu (fólie – Polsko)
14	standard kuřecího kolagenu 1 mg/ml

Dělení probíhalo 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky: jamky č. 13, 14 15 μ l, ostatní vzorky 10 μ l.

Obr. 36: Elektroforéza vzorků čtvrté izolace kolagenů z živočišných tkání a hovězích kolagenních vzorků po testování tepelné stability – 7,5% gel



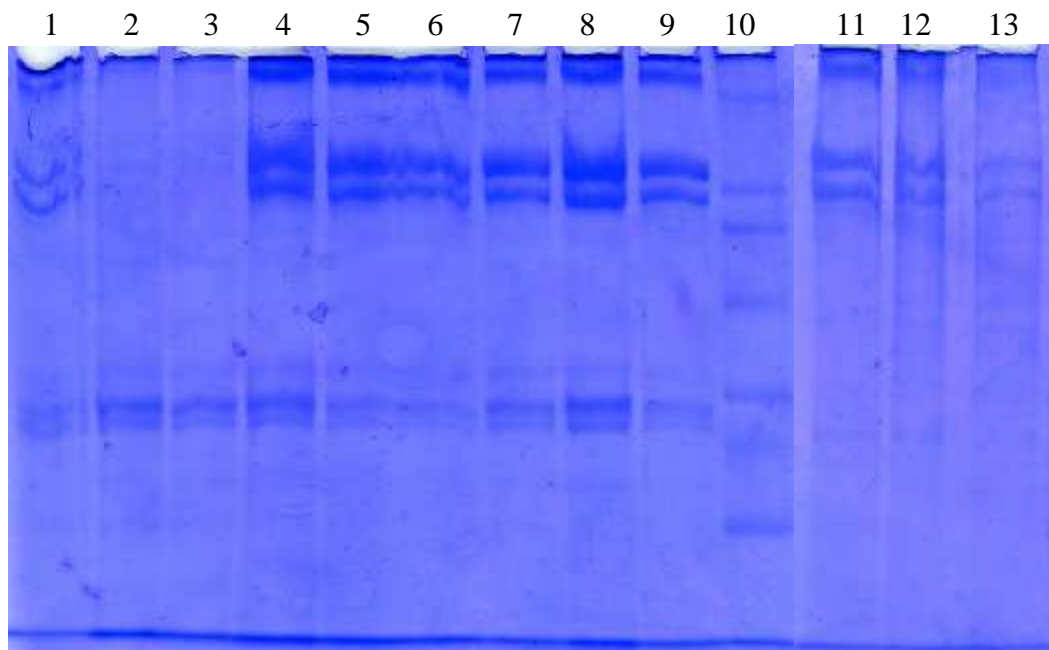
Tabulka 39: Popis k Obr. 36

číslo jamky	vzorek
1	nová izolace – krůtí
2	nová izolace - kuřecí
3	hovězí izolát – záhřev 25 °C + pepsin
4	hovězí izolát – záhřev 30 °C
5	hovězí izolát – záhřev 35 °C
6	hovězí izolát – záhřev 40 °C
7	hovězí izolát – záhřev 45 °C
8	hovězí izolát – záhřev 50 °C
9	hovězí izolát – záhřev 55 °C
10	hovězí izolát – záhřev 60 °C
11	hovězí izolát – záhřev 70 °C
12	hovězí izolát – záhřev 80 °C
13	hovězí izolát – záhřev 90 °C
14	vysokomolekulární bílkovinný standard

15	standard hovězího kolagenu 5 mg/ml + pepsin
----	---

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky: jamka č. 15 15 μ l, ostatní vzorky 10 μ l.

Obr. 37: Elektroforéza kuřecích kolagenních vzorků po testování tepelné stability – 7,5% gel



Tabulka 40: Popis k Obr. 37

číslo jamky	vzorek
1	izolace – kuřecí (rozmix. 30 g) + pepsin
2	kuřecí izolát – záhřev 60 °C + pepsin
3	kuřecí izolát – záhřev 55 °C + pepsin
4	kuřecí izolát – záhřev 50 °C + pepsin
5	kuřecí izolát – záhřev 45 °C + pepsin
6	kuřecí izolát – záhřev 40 °C + pepsin
7	kuřecí izolát – záhřev 35 °C + pepsin
8	kuřecí izolát – záhřev 30 °C + pepsin
9	kuřecí izolát – záhřev 25 °C + pepsin
10	vysokomolekulární bílkovinný standard
11	kuřecí izolát – záhřev 70 °C
12	kuřecí izolát – záhřev 80 °C
13	kuřecí izolát – záhřev 90 °C

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky 10 μ l.

Rybí kolagen (viz *Obr. 35*) je stabilní přibližně do 60 °C, od 70 °C dochází k výrazné denaturaci spojené s rozkladem struktury. Hovězí kolagen (viz *Obr. 36*) je stabilní do 50 °C, kolem této teploty dochází k nějaké přechodné změně struktury a poté dochází k denaturaci až při teplotách 80 – 90 °C. Kuřecí kolagen je stabilní až do 90 °C (viz *Obr. 37*). Z uvedených obrázků gelové elektroforézy je možné konstatovat, že kuřecí kolagen odolává obecně vyšší teplotě lépe než rybí a hovězí, u kterých je vidět od 70 °C výše ztráta viditelných podjednotek kolagenu a jsou nahrazeny souvislým pruhem, který naznačuje pravděpodobně želatinizaci.

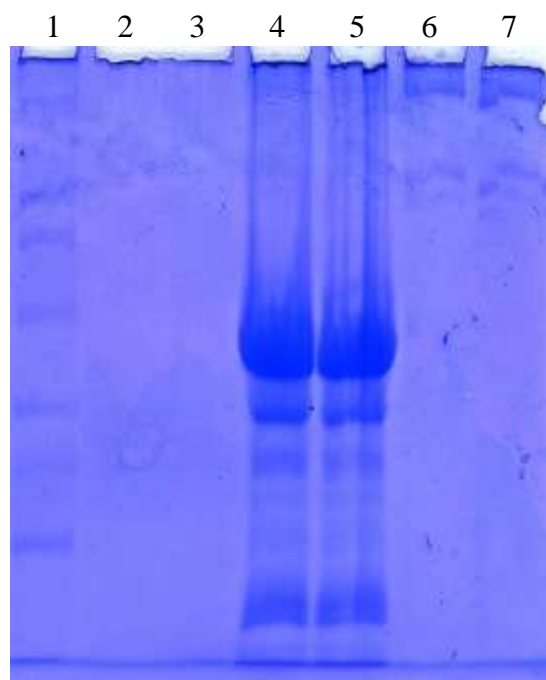
U kuřecího kolagenu tento jev pozorován není, u krůtího nelze posoudit, jelikož testování tepelné stability bylo z důvodu nedostatku materiálu provedeno pouze do 60 °C.

Z vizuálního hodnocení vzorků po testech tepelné stability vyplynulo, že od 50 °C se vzorky krůtího a rybího kolagenu rozpouští, hovězí kolagen částečně, ale u kuřecího kolagenu stále rozpouštění nebylo znatelné. Ještě po hodinové inkubaci při 90 °C (maximální testovaná teplota) byly ve vzorku s kuřecím kolagenem patrné celé kousky kolagenu, které se po roztřepání částečně rozpadaly. Vzorky hovězího a rybího kolagenu byly od cca 70 °C kompletně rozpuštěny, vzorky tvořily na pohled homogenní roztok, který po uložení v lednici ztuhl do formy tuhého gelu. Tuhý gel se při uschování vzorků v chladu objevoval i u vzorků kuřecího kolagenu, a to při 70 a 80 °C (i u krůtího kolagenu při 60 °C).

4.5.6 Testování fyziologické stability kolagenních izolátů metodou PAGE-SDS

Druhou metodou sledování stability a vlastností izolovaných kolagenů byla simulace tří modelových fyziologických prostředí: fyziologický pufr, lidské sérum a fyziologický pufr + kolagenáza. Inkubace byla prováděna při laboratorní teplotě (25 °C) a 37 °C po dobu od 2 do 48 hodin. Metodou PAGE-SDS byly analyzovány pouze vzorky po 48 hodinové inkubaci.

Obr. 38: Elektroforéza vepřových kolagenních vzorků po testování biologické stability (48 h) – 7,5% gel



Tabulka 41: Popis k

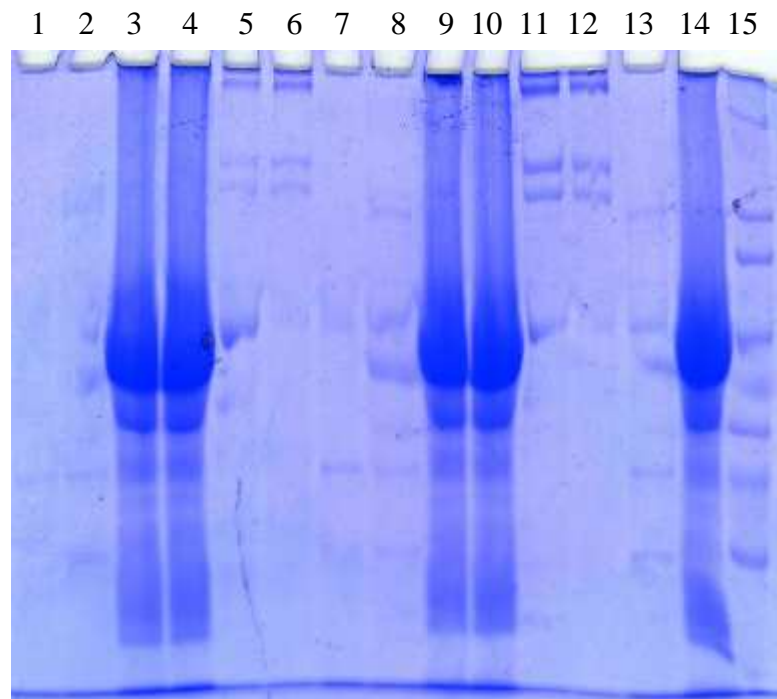
Obr. 38

číslo jamky	vzorek
1	vysokomolekulární bílkovinný standard
2	vepřový izolát – prostředí kolagenázy 37 °C
3	vepřový izolát – prostředí kolagenázy 25 °C
4	vepřový izolát – lidské sérum 37 °C

5	vepřový izolát – lidské sérum 25 °C
6	vepřový izolát – fyziologický pufr 37 °C
7	vepřový izolát – fyziologický pufr 25 °C

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky 10 µl.

Obr. 39: Elektroforéza kuřecích a krůtích kolagenních vzorků po testování biologické stability (48 h) – 7,5% gel



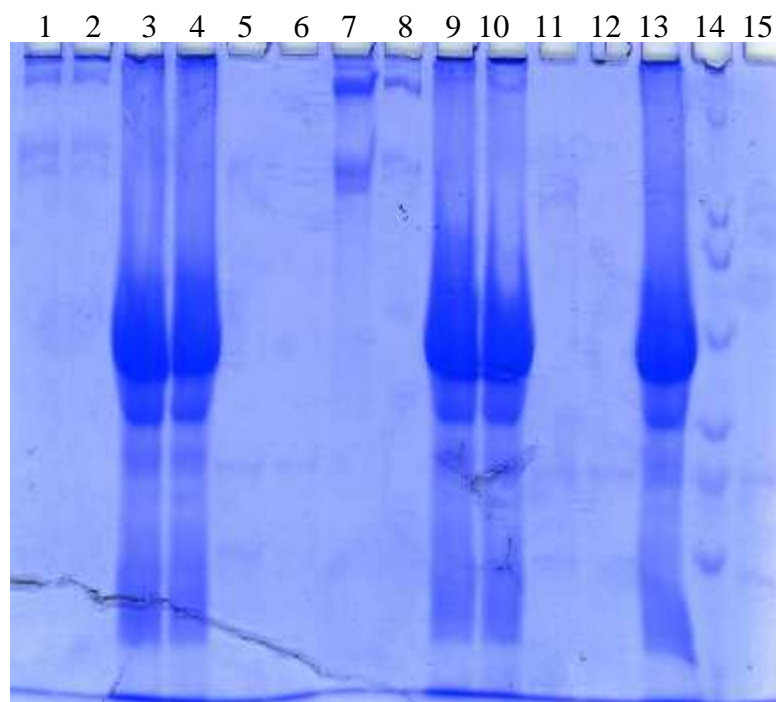
Tabulka 42: Popis k

Obr. 39

číslo jamky	vzorek
1	krůtí izolát – prostředí kolagenázy 37 °C
2	krůtí izolát – prostředí kolagenázy 25 °C
3	krůtí izolát – lidské sérum 37 °C
4	krůtí izolát – lidské sérum 25 °C
5	krůtí izolát – fyziologický pufr 37 °C
6	krůtí izolát – fyziologický pufr 25 °C
7	kuřecí izolát – prostředí kolagenázy 37 °C
8	kuřecí izolát – prostředí kolagenázy 25 °C
9	kuřecí izolát – lidské sérum 37 °C
10	kuřecí izolát – lidské sérum 25 °C
11	kuřecí izolát – fyziologický pufr 37 °C
12	kuřecí izolát – fyziologický pufr 25 °C
13	kolagenáza ve fyziologickém pufru
14	lidské sérum
15	vysokomolekulární bílkovinný standard

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky 10 µl.

Obr. 40: Elektroforéza hovězích a rybích kolagenních vzorků po testování biologické stability (48 h) – 7,5% gel



Tabulka 43: Popis k Obr. 40

číslo jamky	vzorek
1	hovězí kolagen – fyziologický pufr 25 °C
2	hovězí kolagen – fyziologický pufr 37 °C
3	hovězí kolagen – lidské sérum 25 °C
4	hovězí kolagen – lidské sérum 37 °C
5	hovězí kolagen – prostředí kolagenázy 25 °C
6	hovězí kolagen – prostředí kolagenázy 37 °C
7	rybí izolát – fyziologický pufr 25 °C
8	rybí izolát – fyziologický pufr 37 °C
9	rybí izolát – lidské sérum 25 °C
10	rybí izolát – lidské sérum 37 °C
11	rybí izolát – prostředí kolagenázy 25 °C
12	rybí izolát – prostředí kolagenázy 37 °C
13	lidské sérum
14	vysokomolekulární bílkovinný standard
15	kolagenáza ve fyziologickém pufru

Separace probíhala 4 hodiny, 30 minut při 90 V, 120 mA, nanášky 10 µl.

Při testování biologické stability všech kolagenních izolátů i komerčního hovězího kolagenu vykazují vzorky stejný způsob chování v různých fyziologických prostředích, přičemž výsledky na gelech prokazují, že rozdílná teplota inkubace nemá nijak významný vliv.

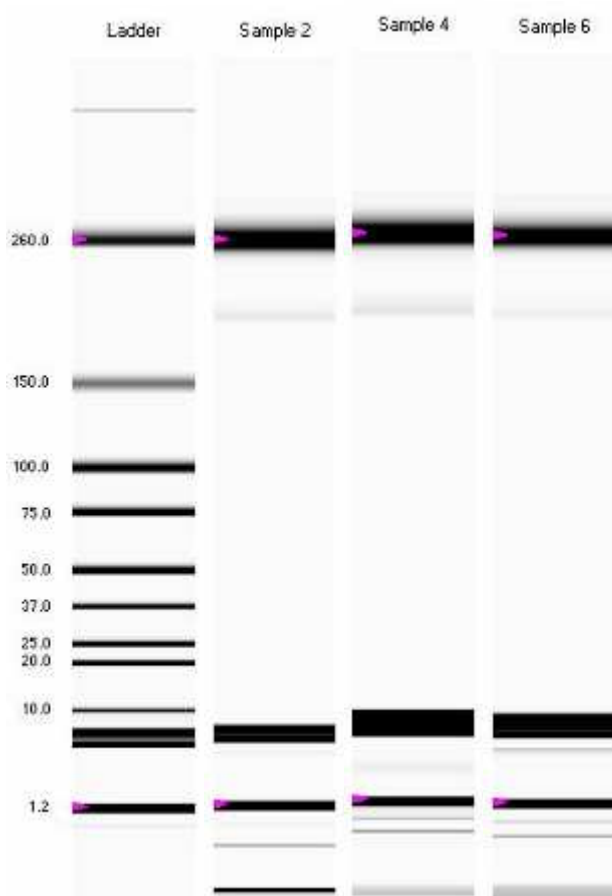
Ve fyziologickém pufru zůstaly všechny vzorky kolagenu relativně stabilní (na gelech jsou vidět jasně ohraničené podjednotky molekuly). Po inkubaci v lidském séru to na základě výsledků PAGE-SDS nelze jednoznačně potvrdit, jelikož proteiny séra překryly fragmenty

kolagenu a tudíž na gelech vidět nejsou. Existuje i možnost, že fragmenty nejsou viditelné z důvodu degradace kolagenu v tomto prostředí, ta je však málo pravděpodobná i proto, že všechny vzorky kolagenů evidentně zůstaly po inkubaci nerozpuštěny. V prostředí kolagenázy došlo dle očekávání k degradaci kolagenu u všech izolovaných vzorků, což se projevilo vymizením kolagenových fragmentů na gelu, jelikož enzym je specifický právě pro štěpení kolagenu. Toto prostředí jako jediné bylo schopno rozpustit všechny vzorky kolagenů. Na gelech lze také vidět, že čistá kolagenáza vykazuje více fragmentů a tyto frakce zůstávají v preparátech i po inkubaci, enzym je tedy v daném prostředí a teplotě poměrně stabilní.

4.6 Separace kolagenových vzorků pomocí mikročipové elektroforézy

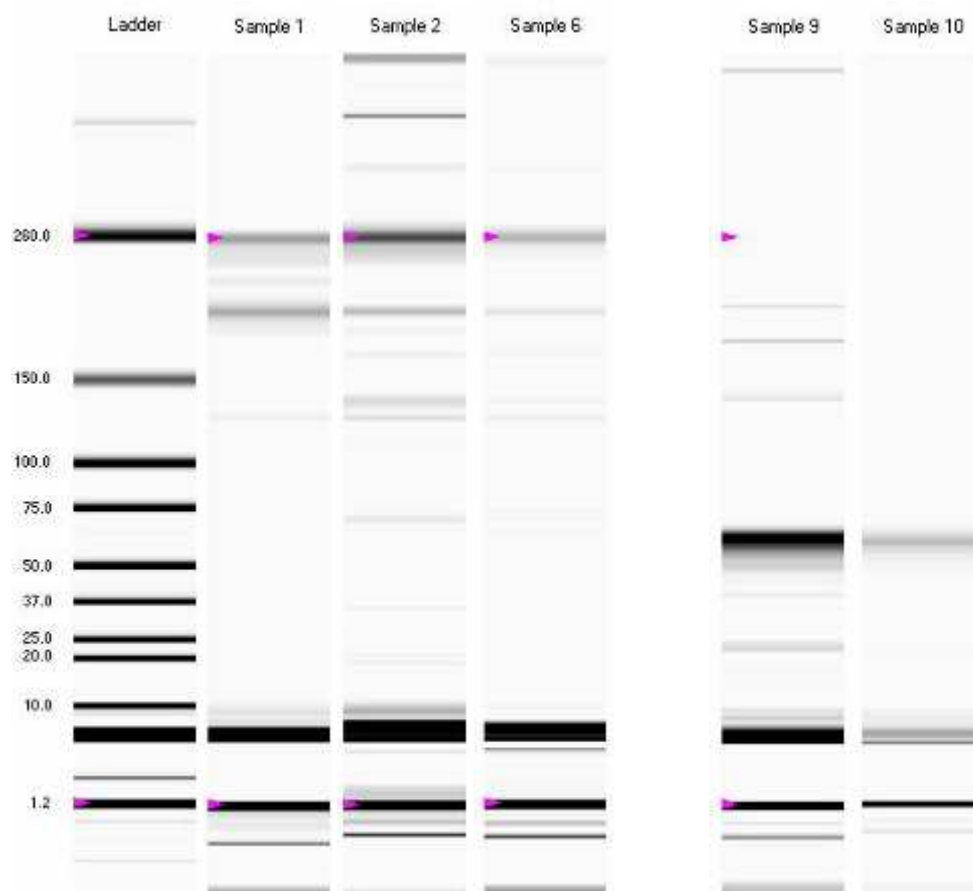
Jako srovnávací metody k PAGE-SDS při analýze kolagenů bylo využito mikrofluidního elektroforetického systému Experion (Bio-Rad, USA). Analýza probíhá na čipu, výhodou je manipulace s malými objemy jak reakčních roztoků, tak i vzorků samotných a rychlé provedení analýzy (do 30 minut). Nemožnost do analýzy jakkoliv zasahovat, nastavit si parametry separace (jako je např. hustota gelu, čas analýzy) se může zpočátku jevit jako výhoda z hlediska snadné obsluhy, která se záhy mění ve značnou nevýhodu oproti metodě PAGE-SDS, která je flexibilní ke změnám podmínek, zato však časově náročná (po samotné několika hodinové analýze ještě následuje krok barvení a odbarvování).

Obr. 41: Mikročipová elektroforéza – proteinový standard (ladder) a standard kuřecího kolagenu (sample 2, 4, 6)



Proteinový standard (ladder) byl správně detekován se všemi jeho molekulovými hmotnostmi, i ve vzorcích byly detekovány oba (dolní i horní) markery (viz růžové šipky), a proto je software schopen vypočítat molekulovou hmotnost neznámého vzorku, kterým je v daném případě standard kuřecího kolagenu (nanesen do jamek číslo 2, 4 a 6) a je dobře v drahách viditelný. Bandy leží mezi standardy o velikosti 150 000 Da a 260 000 Da. Molekulová hmotnost kuřecího standardního kolagenu, dle této analýzy, je odhadem okolo 200 000 Da. Software ve všech třech jamkách identifikoval pouze jeden vzorkový pík s molekulovou hmotností 200,32 kDa a koncentrací 3,4 ng/μl (jamka č. 2), 200,61 kDa, 3,7 ng/μl (jamka č. 4) a 200,09 kDa, 1,3 ng/μl (jamka č. 6).

Obr. 42: Mikročipová elektroforéza – proteinový standard (ladder) a standard hovězího kolagenu s pepsinem (sample 1, 2, 6) + čistý roztok pepsinu (sample 9, 10)



Proteinový standard byl opět detekován správně, ve vzorku č. 10 ovšem nebyly detekovány hmotnostní markery. Dráhy číslo 1, 2 a 6 obsahují standard hovězího kolagenu rozpuštěného pomocí pepsinu, viditelných je několik fragmentů, významný band opět okolo 200 000 Da, který odpovídá molekulové hmotnosti kolagenu, další okolo 130 kDa, který by mohl odpovídat podjednotce (α -řetězci) kolagenu. Další viditelné fragmenty mohou být způsobeny v důsledku přidání pepsinu. Pro srovnání je nanesen i čistý pepsin jako vzorky číslo 9 a 10, kde je významný band okolo 60 kDa.

V této analýze software Experion identifikoval v každé jamce píků hned několik, v první jamce čtyři píky vzorku s molekulovými hmotnostmi a koncentrací: 9,62 kDa (44,4 ng/μl), 127,84 kDa (9,7 ng/μl), 203,54 kDa (106,6 ng/μl) a 227,55 kDa (5,4 ng/μl). Program vypočítá

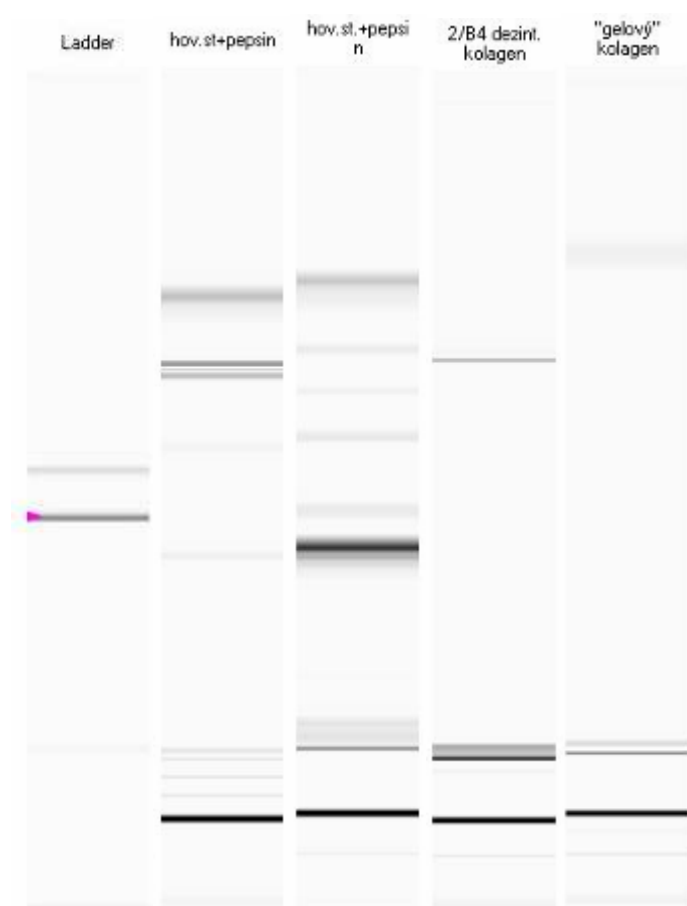
i celkovou koncentraci vzorku a z ní procentuální zastoupení jednotlivých píků. Zde měl nejvyšší procentuální zastoupení (64,2 %) pík o velikosti 203,54 kDa, druhým, koncentračně poměrně výrazným píkem, je první pík (9,62 kDa).

V jamce číslo 2, kde byl nanesen stejný vzorek jako v jamce předchozí, program identifikoval 15 píků ve vzorku, první pík má 9,71 kDa (67,6 ng/μl), další s výraznějším zastoupením ve vzorku je pík s molekulovou hmotností 138,16 kDa a 203,46 kDa.

V šesté jamce byly identifikovány pouze dva píky ve vzorku a to s molekulovou hmotností 127,03 kDa (14,5 ng/μl) a 202,72 kDa (28 ng/μl). V deváté jamce, kam byl nanesen čistý roztok pepsinu program identifikoval 10 různých píků, z nichž nejvýraznější má molekulovou hmotnost 62,97 kDa a vysokou koncentraci 28 508,3 ng/μl.

Veškeré získané výsledky potvrzují, že ve vzorcích kolagenu je přítomna frakce o molekulové hmotnosti cca 200 kDa a podjednotky o molekulové hmotnosti cca 130 – 138 kDa, což odpovídá relitě (viz *Obr. 3*, str. 33 a kapitola 2.5).

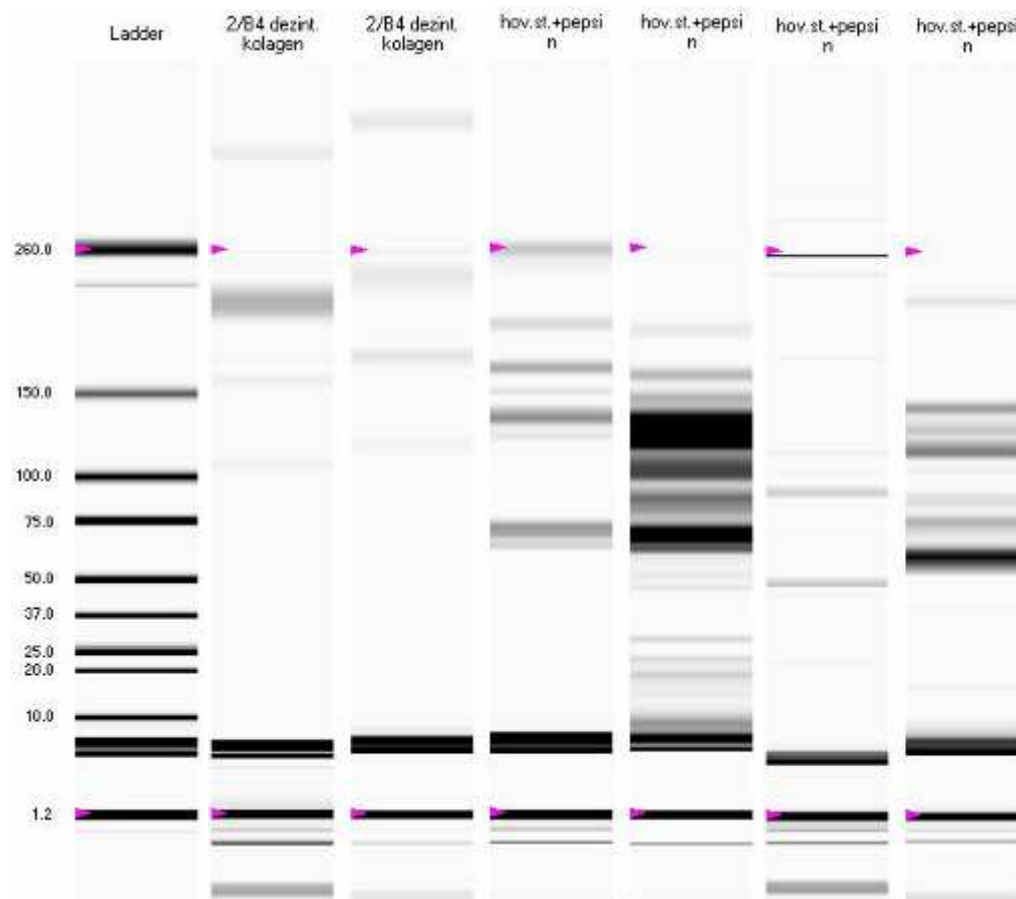
Obr. 43: Mikročipová elektroforéza – standard hovězího kolagenu a vzorků kolagenů z ÚCHM (viz Tabulka 20: Seznam používaných modifikovaných kolagenních materiálů získaných z ÚCHM FCH VUT v Brně)



Proteinový standard nebyl správně detekován, pravděpodobně z důvodu jeho světelné degradace (obsahuje látky velmi labilní na světle), tudíž software nedokáže identifikovat neznámé vzorky. Fragmenty hovězího standardního kolagenu s pepsinem jsou podobné jako na předchozím čipu (viz *Obr. 42*, vzorky 1, 2, 6). Otestovány byly také vzorky z ÚCHM,

kde je viditelný vždy pouze jeden band, kromě bandů pravděpodobně systémových píků, ale není možné určit jejich molekulové hmotnosti. Lze pouze konstatovat, že dezintegrovaný vzorek má pravděpodobně nižší molekulovou hmotnost, než surový („gelový“) hovězí kolagen.

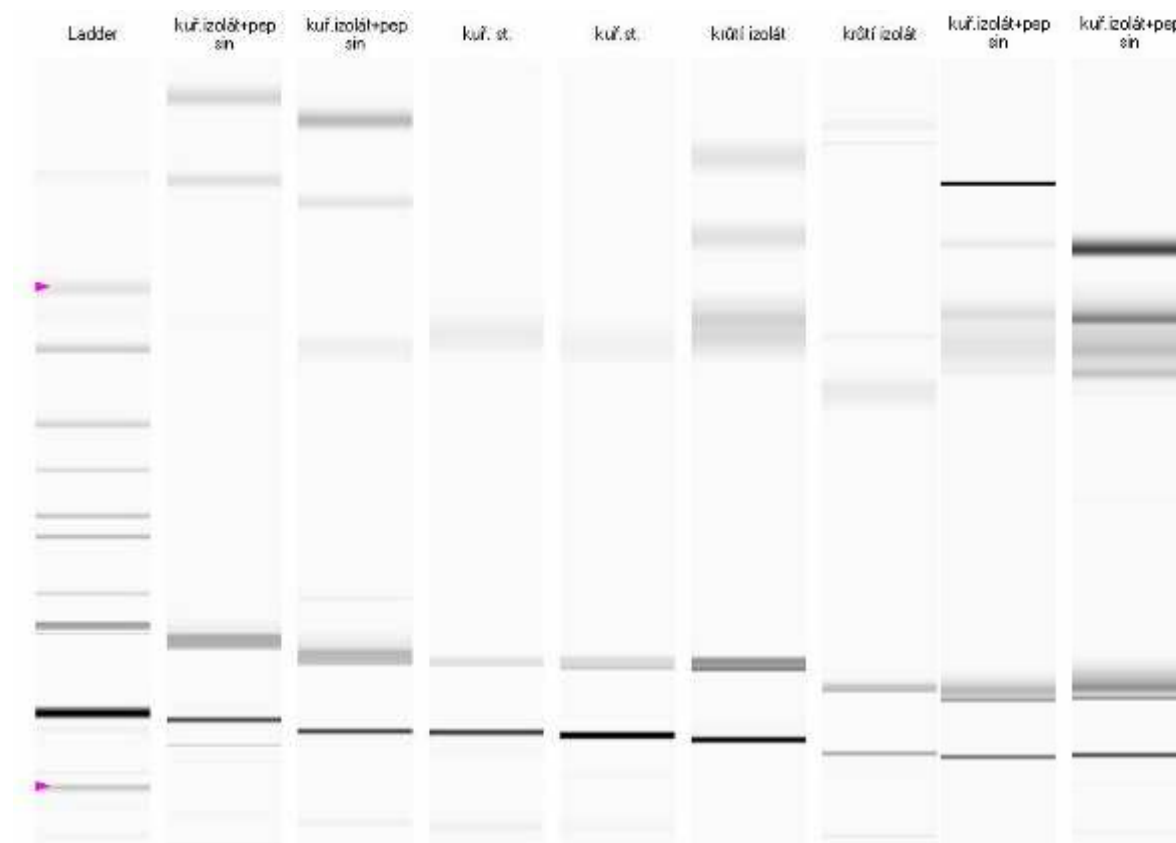
Obr. 44: Mikročipová elektroforéza – proteinový standard (ladder) a standard hovězího kolagenu s pepsinem + vzorky kolagenů z ÚCHM (viz Tabulka 20: Seznam používaných modifikovaných kolagenních materiálů získaných z ÚCHM FCH VUT v Brně)



Při opětovné analýze standardu hovězího kolagenu s pepsinem spolu se vzorkem z ÚCHM, byl proteinový standard detekován správně, ve všech vzorcích byly detekovány hmotnostní markery. U hovězího standardního kolagenu se však objevuje kromě typických fragmentů pro kolagen a pepsin opět mnoho neurčitých bandů, které by mohly odpovídat neštěpení kolagenu. U modifikovaného dezintegrovaného vzorku jsou vidět tři fragmenty o přibližné molekulové hmotnosti 110 kDa, 160 kDa a 240 kDa, ovšem při druhé nanáске stejného vzorku s posunem směrem do vyšších molekulárních hmotností u všech tří bandů.

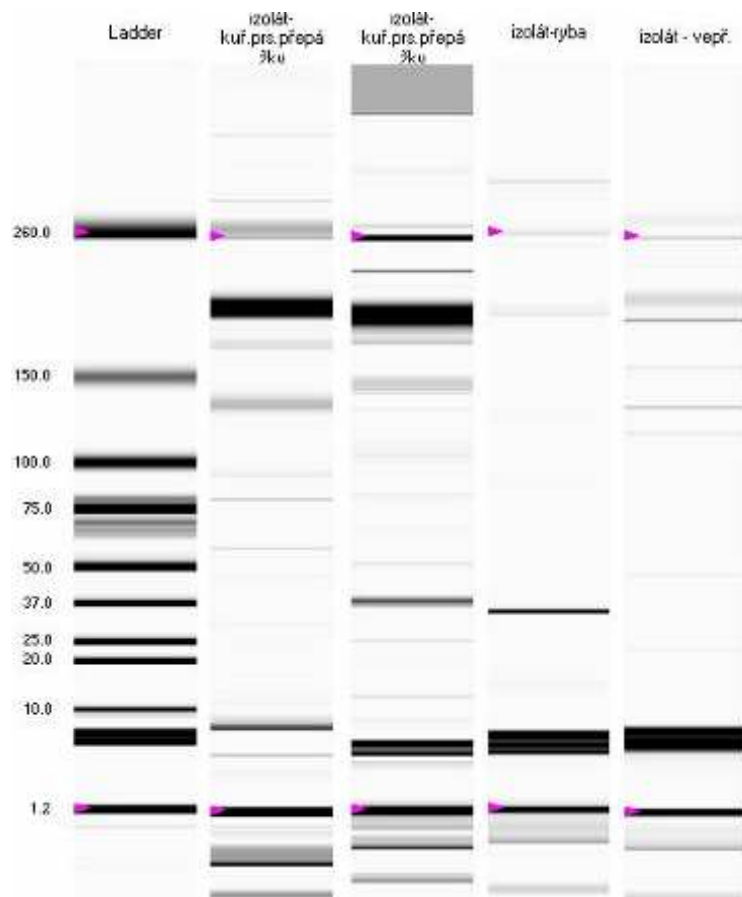
U modifikovaného kolagenního vzorku 2/B4 program nejprve neidentifikoval žádný pík ve vzorku, při druhé nanáске rozpoznal tři vzorkové píky s molekulovými hmotnostmi 12,45, 61,09 a 120,37 kDa, přičemž poslední z nich koncentračně výrazně převyšoval. U vzorků hovězího standardního kolagenu s pepsinem bylo opět identifikováno ve všech případech více píků, z těch výrazněji zastoupených a ve všech vzorcích se opakujících to jsou píky s molekulovou hmotností okolo 60 – 70 kDa, 120 – 130 kDa a 190 – 200 kDa. Poslední dva odpovídají molekulové hmotnosti kolagenu.

Obr. 45: Mikročipová elektroforéza – proteinový standard (ladder), standard kuřecího kolagenu, vyizolovaný kuřecí, krůtí kolagen z kůží a z kuřecích hrudních chrupavek



Tato ukázka čipové elektroforetické analýzy ukazuje možnost, kdy se proteinový standard sice rozdělil, ale nebyla u něj detekována molekulová hmotnost, což opět znemožňuje výpočet molekulové hmotnosti nanesených vzorků. Zde byly testovány vyizolované kuřecí a krůtí kolageny spolu se standardem kuřecího kolagenu, u izolátů jsou viditelné frakce blížící se hornímu markeru (260 kDa), kuřecí standard vykazuje band podobný předchozím analýzám (viz *Obr. 41*).

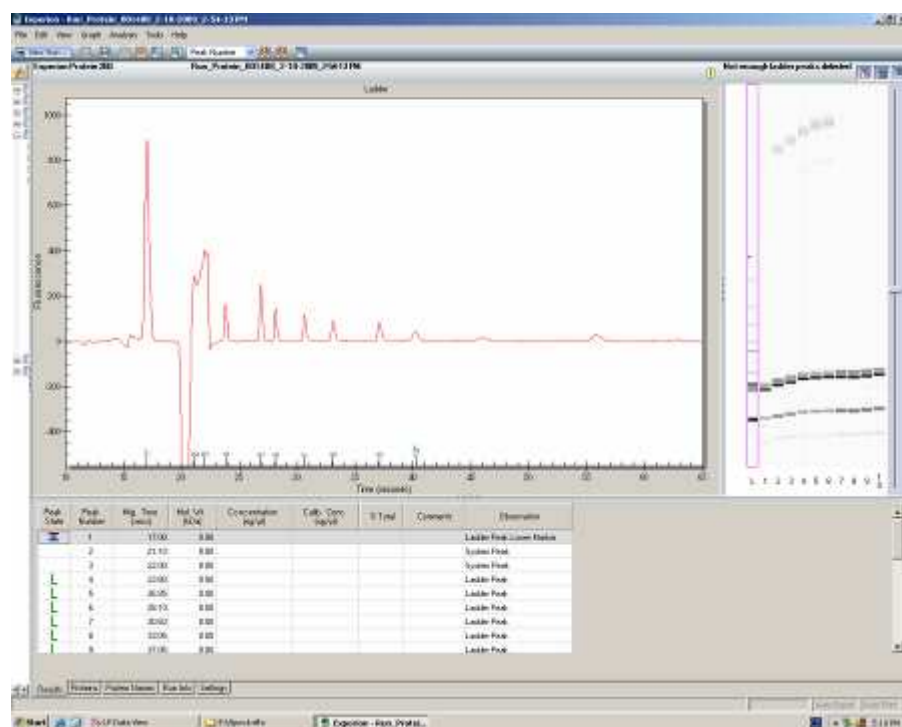
Obr. 46: Mikročipová elektroforéza – proteinový standard (ladder), vyizolovaný rybí, vepřový kolagen z kůží a kuřecí z hrudních chrupavek



Proteinový standard správně rozdělen a detekován, ve vzorcích detekovány hmotnostní markery. Naneseny byly opět izoláty kolagenu, tentokrát vepřový, rybí a z kuřecích hrudních chrupavek. Kolagen z kuřecích chrupavek vykazuje spoustu frakcí, což by mohlo svědčit o přítomnosti i jiných proteinů než je kolagen, stejně jako bylo konstatováno u metody PAGE-SDS (viz *Obr. 32*, jamky číslo 4 a 10). Všechny tři izolované kolageny mají významný band okolo 200 kDa, přičemž rybí izolát má tento band méně viditelný než fragment okolo 35 kDa, který se při separaci na gelu metodou PAGE-SDS vůbec neobjevuje.

Program Experion identifikoval v prvním preparátu z kuřecích prsních přepážek 8 píků s nejvýraznějšími 53,23 kDa, 72,48 kDa a 200,07 kDa, ve stejném preparátu v další jamce byly identifikovány píky pouze dva s molekulovou hmotností 82,37 a 206,17 kDa. V preparátu kolagenu izolovaného z rybích kůží bylo identifikováno 9 píků s výrazným píkem s 34,64 kDa a dalšími dvěma 198,41 a 204,93 kDa. V preparátu kolagenu izolovaného z vepřových kůží byl výrazný pík okolo 210 kDa. U všech preparátů se tedy objevují stále stejné majoritní píky odpovídající kolagenovým podjednotkám.

Obr. 47: Ukázka celého výstupu software Experion při mikročipové elektroforéze



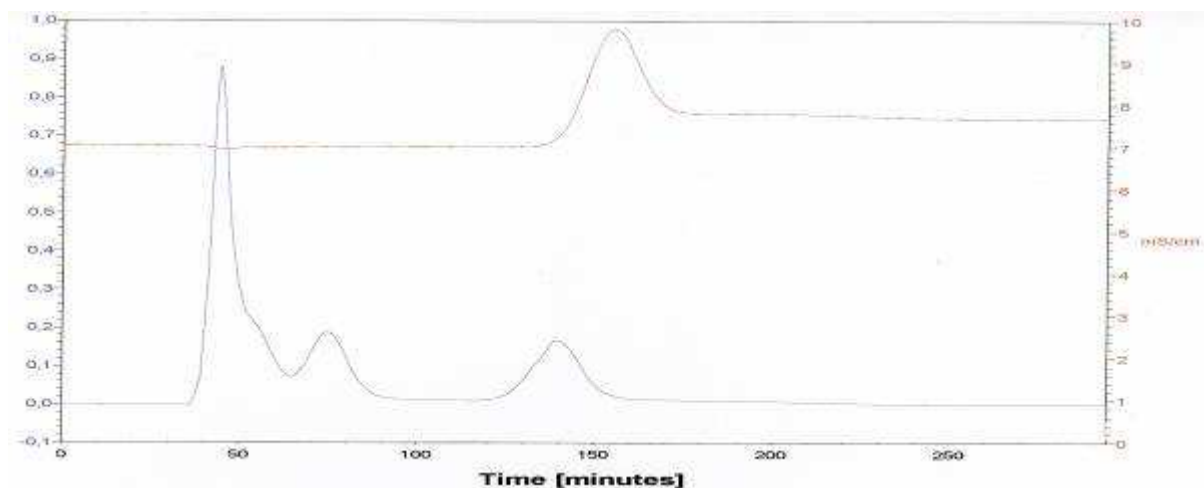
4.7 Gelová chromatografie vzorků kolagenů

Purifikace izolovaných preparátů kolagenu byla testována na koloně naplněné gelem Biogel P-100 (viz kapitola 3.4.3). Kolonová chromatografie se k purifikaci kolagenu používá spíše omezeně, zejména s ohledem na omezenou rozpustnost kolagenu. V předložené práci byla separace testována na preparátu kuřecího a hovězího kolagenu. Zatímco kuřecí kolagen se podařilo převést do rozoku pomocí pepsinu a nedocházelo k problémům při gelové filtraci, část kolagenu hovězího se nepodařilo rozpustit a zůstala na startu. Tím nebylo však zkomplikováno dělení proteinů v částečně rozpuštěném vzorku.

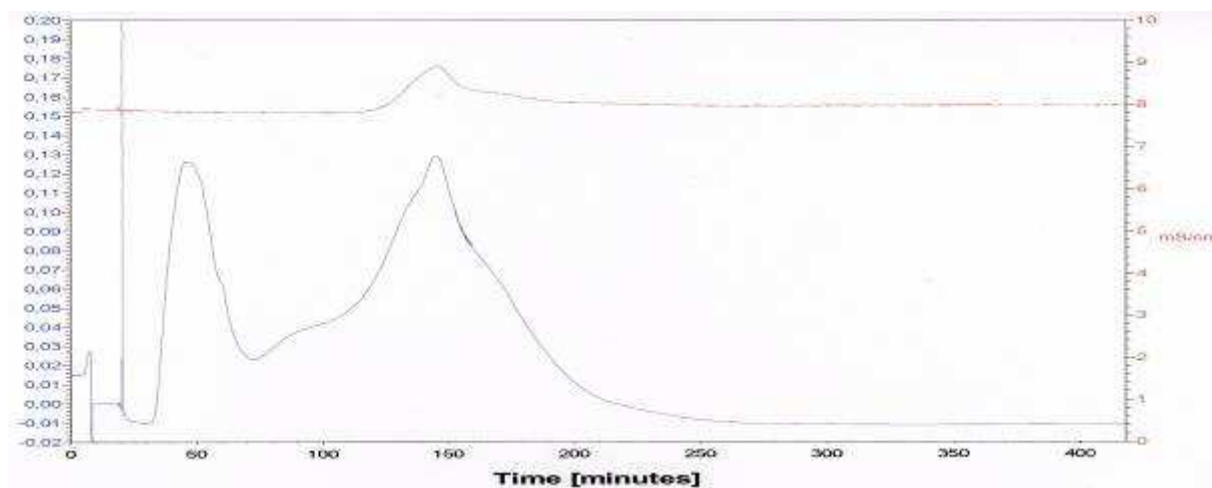
Výpovědní hodnota nízkotlaké gelové chromatografie je omezena vylučovacím limitem gelu (100 kDa), tomuto omezení odpovídají i získané výsledky.

Nejprve byl nosič testován s využitím směšného standardu obsahujícího proteiny o molekulové hmotnosti 670 – 1,35 kDa uvedené v kapitole 3.4.3. Dva z těchto proteinů (globuliny) by měly být eluovány v rámci mrtvého objemu, avšak na záznamu chromatografie (viz Obr. 48) se zdá, že došlo k jejich oddělení. První pík zřejmě odpovídá thyreoglobulinu (retenční čas cca 40 min), druhý pík pak odpovídá zřejmě gama-globulinu (retenční čas cca 70 min) a další pík pravděpodobně ovalbuminu (44 kDa, 150 min). Menší proteiny nejsou na chromatogramu patrné, zřejmě díky jejich podstatně nižší koncentraci (2 – 10 x) ve směšném standardu.

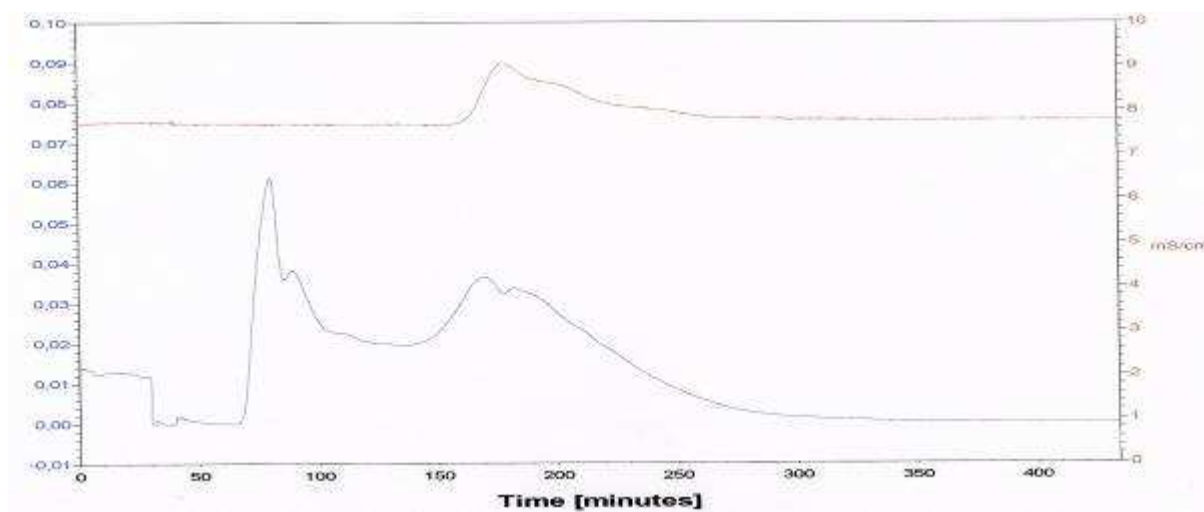
Obr. 48: Chromatogram proteinového standardu



Obr. 49: Chromatogram hovězího kolagenu



Obr. 50: Chromatogram kuřecího kolagenu



Výsledky separace hovězího kolagenu potvrzují přítomnost jednoho velkého píku odpovídajícího molekulové hmotnosti kolem cca 200 kDa (i více). Pak je v záznamu patrný

menší pík v cca 90.minutě, který by mohl odpovídat podjednotce o velikosti cca 130 kDa. Výrazný pík v retenčním čase s maximem cca 150 min odpovídá zřejmě několika podjednotkám pepsinu pozorovaným i v PAGE-SDS.

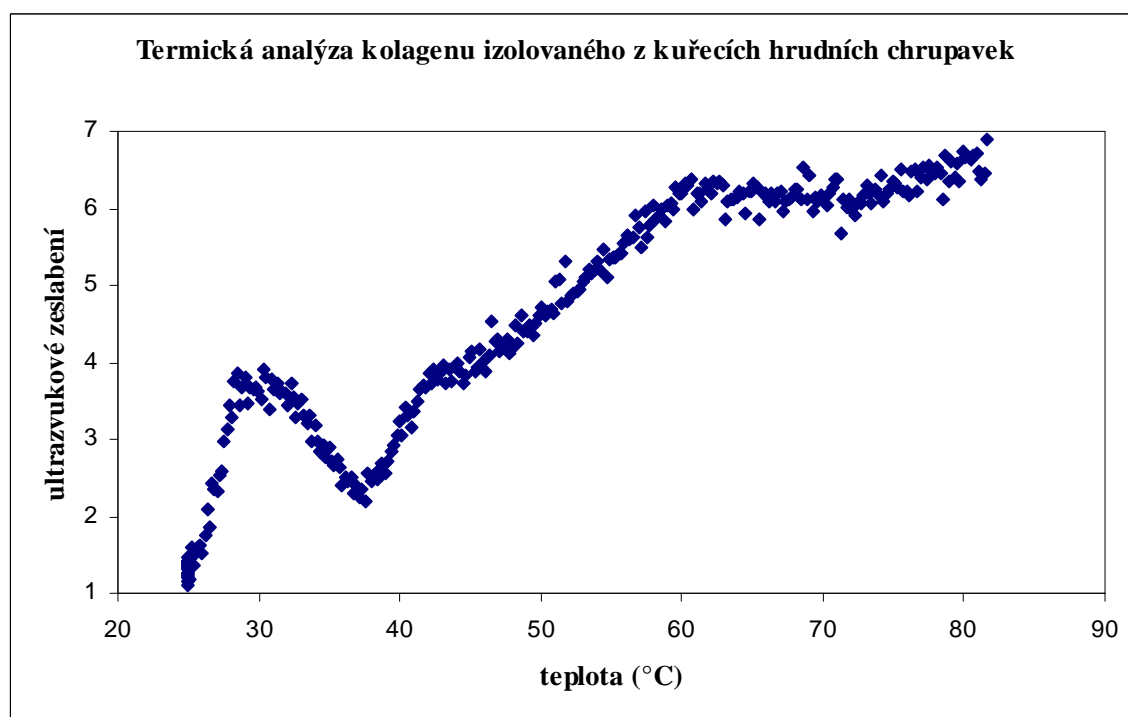
Analýza kuřecího kolagenu z kůže potvrzuje přítomnost dvou podjednotek o velikosti cca 120 – 150 kDa a pak směsný pík odpovídající pepsinu.

Zvýšení vodivosti v cca 150 – 200. minutě odpovídá zvýšené koncentraci nabitých částic, mohlo by jít i o leuci zbytků solí v preparátu.

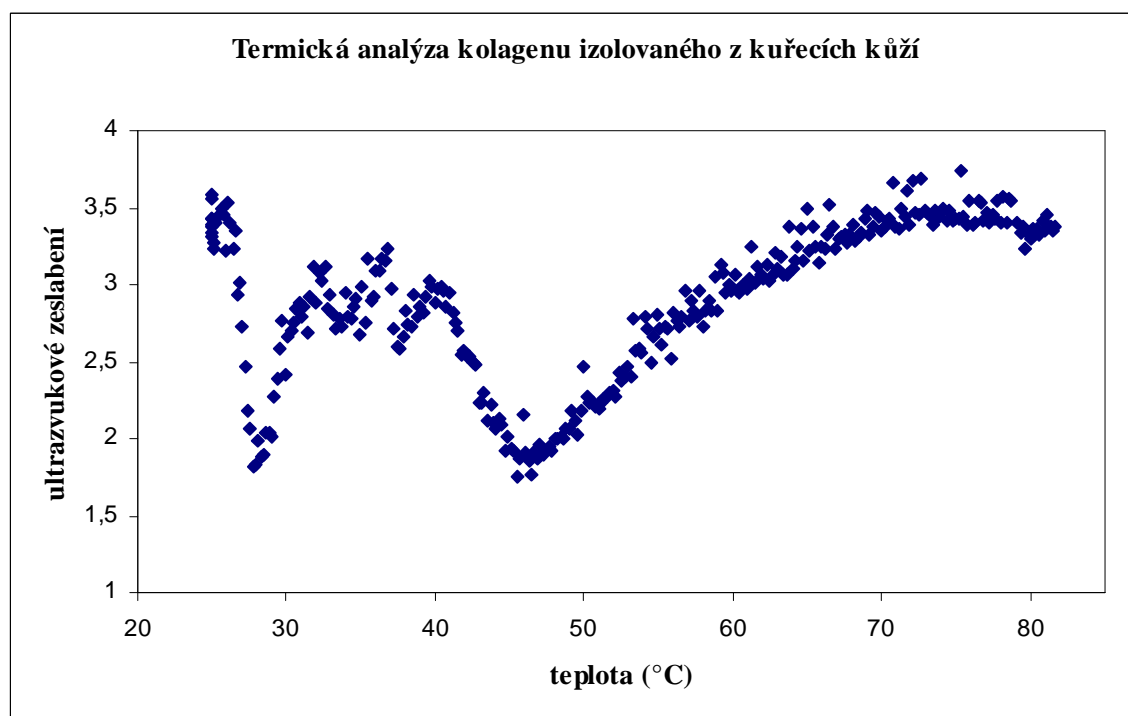
4.8 Termická analýza kolagenů pomocí ultrazvukové spektroskopie

Ve spolupráci s ÚFSCH FCH VUT v Brně byla změřena data termické analýzy metodou ultrazvukové spektroskopie. Měřeny byly vzorky kolagenu izolovaného z kuřecích hrudních chrupavek, kuřecích, krůtích a rybích kůží a surový hovězí kolagen v koncentraci asi 50 – 85 mg/ml (dle množství dostupného materiálu).

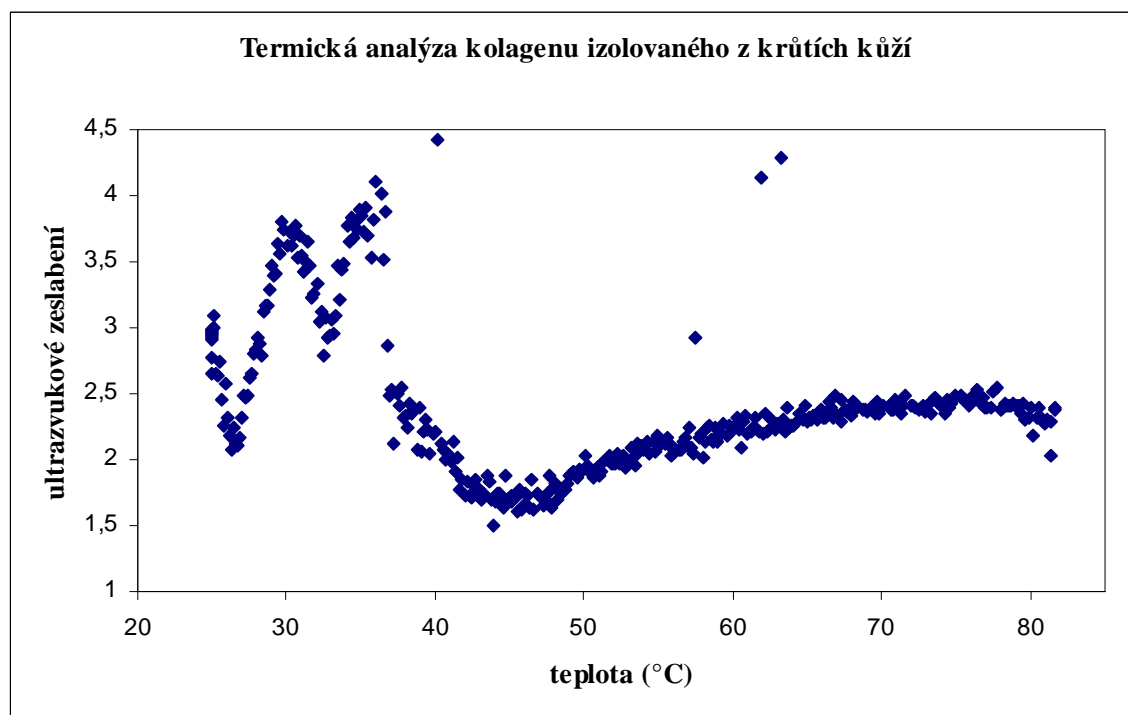
Graf 4: Termická analýza kolagenu izolovaného z kuřecích hrudních chrupavek



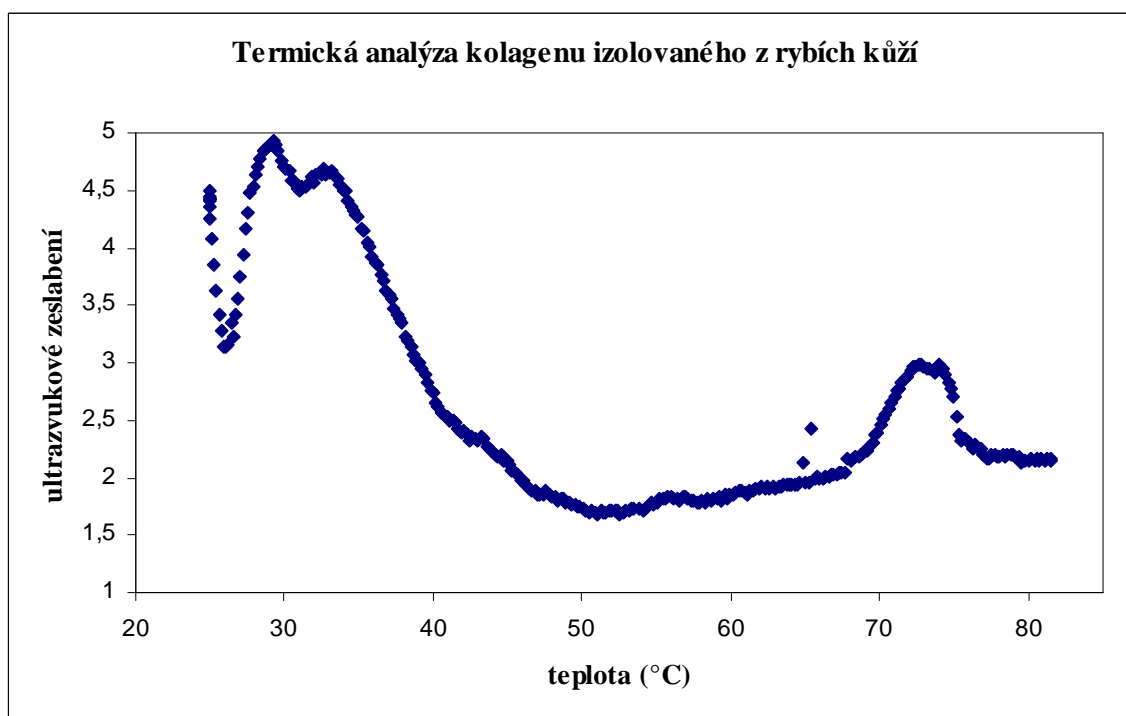
Graf 5: Termická analýza kolagenu izolovaného z kuřecích kůží



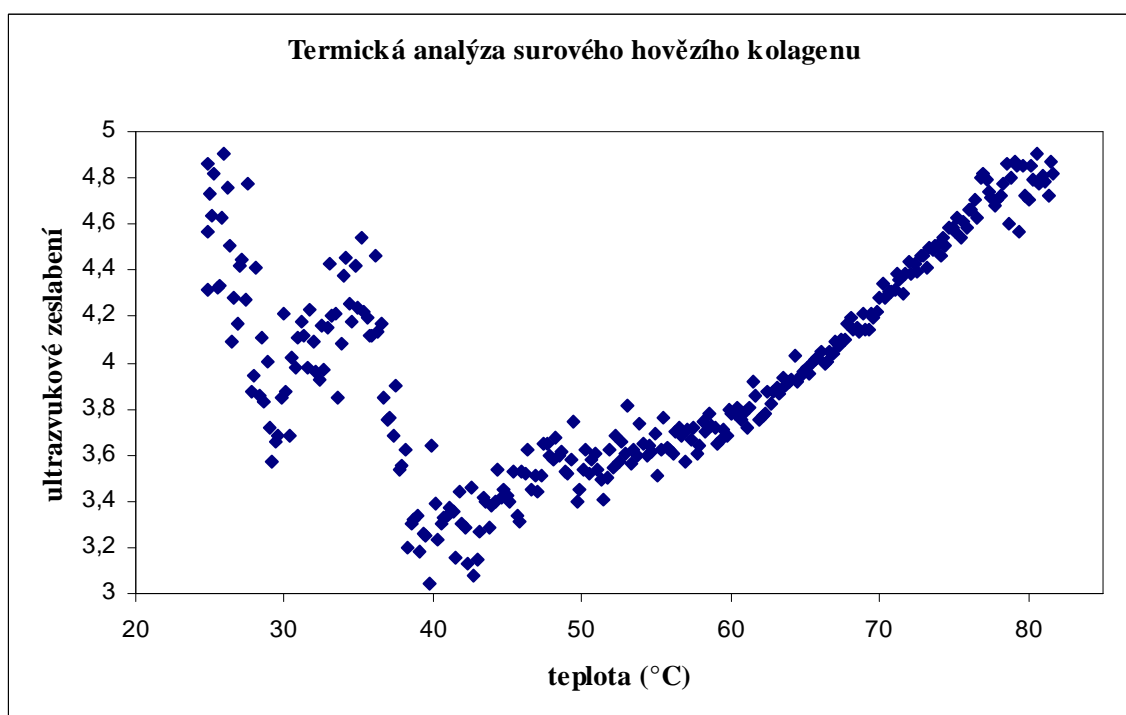
Graf 6: Termická analýza kolagenu izolovaného z krůtích kůží



Graf 7: Termická analýza kolagenu izolovaného z rybích kůží



Graf 8: Termická analýza surového hovězího kolagenu



Vyneseným parametrem je ultrazvukové zeslabení (ultrasonic attenuation). Obecně se dá říci, že pokud jeho hodnota klesá, jedná se o rozpouštění, disagregaci (odezva na teplo), vzrůstá-li, jedná se o procesy agregace (což může být i želatinace).

U všech vzorků je viditelný společný přechod (zlom) okolo 37 °C, s výjimkou kuřecího kolagenu z hrudních chrupavek (typ II), kde je tento přechod posunut do nižších teplot

(cca 30 °C). U všech vzorků (opět kromě kuřecího z hrudních chrupavek) při počátečním zahřívání od 25 °C signál klesá (vzorky se rozpouští) asi do 27 – 28 °C (hovězí kolagen až do cca 30 °C). Od zhruba 45 °C končí proces rozpouštění (kuřecí, krůtí kůže) a signál při dalším zahřívání už jen roste (agregace) – u hovězího vzorku tento jev posunut již od cca 40 °C, u rybího až od cca 50 °C, s pozvolným růstem a skokovým vzrůstem od 70 °C. U vzorku kolagenu z kuřecích hrudních chrupavek je od 37 °C pozorovatelný jenom poměrně strmý nárůst signálu.

Obecně lze říci, že kolagen typu II (z kuřecích hrudních chrupavek) se chová při termické analýze odlišně od ostatních vzorků (kolageny typu I), které vykazují podobný trend signálu ultrazvukového zeslabení. První maximální nárůst signálu se objevuje mezi 30 a 40 °C, ve dvou po sobě následujících vlnách (kromě hovězího vzorku – ten má v těchto teplotách pouze jeden vrchol).

Při srovnání výsledků s analýzou metodou PAGE-SDS, kde bylo možné konstatovat, že je hovězí kolagen cca od 70 °C degradován (želatinizace), lze tohle vyčíst i termických dat, kdy dochází k nepřetržitému nárůstu signálu (hovězí kolagen dosahuje v těchto teplotách ze všech vzorků vůbec nejvyššího signálu). Výsledky z termické analýzy hovězího kolagenu (strmý vzrůst od 55 °C) podporují i náznak postupné degradace kolagenu již od 50 °C na gelu (PAGE-SDS) viz *Obr. 36*. Elektroforetická analýza není tak přesná, záleží na mnoha faktorech (koncentraci naneseného vzorku, citlivosti barvení, intenzitě odbarvení pozadí), co vše na gelu bude vidět.

U vzorku kuřecího kolagenu na gelu není viditelný proces želatinizace při vyšších teplotách podobně jako u hovězího vzorku. Termická data ukazují, že od cca 70 °C signál roste jen velmi pomalu, spíše se ustaluje na určité hladině a dále neroste. Tyto data mohou potvrzovat podobné zjištění metodou PAGE-SDS u kuřecího kolagenu, kdy nebyla pozorovatelná tepelná degradace až do 90 °C a stále jsou vidět zachované podjednotky kolagenu z kuřecích kůží (viz *Obr. 37*).

4.9 Aminokyselinové složení vzorků kolagenů

Aminokyselinové složení bylo analyzováno u vzorků kuřecího, krůtího a hovězího kolagenu.

Tabulka 44: Obsah celkových dusíkatých látek v analyzovaných kolagenech

	obsah celkových dusíkatých látek (g/kg)
kuřecí	101,7
krůtí	136,8
hovězí	984,0

Tabulka 45: Aminokyselinové složení analyzovaných kolagenů

	obsah aminokyselin (g/kg)		
	kuřecí	krůtí	hovězí
Asp	6,4	9,7	59,4
Thre	2,5	4,2	17,9
Ser	2,8	4,3	32,5

Glu	9,6	14,5	95,7
Pro	8,3	9,9	147,4
Gly	13,5	14,7	195,6
Ala	6,4	8,0	86,2
Val	2,9	4,8	24,1
Met	1,3	2,5	5,4
Iso	2,5	4,2	15,3
Leu	4,6	7,6	29,9
Tyr	1,6	3,0	4,9
Phe	2,4	3,9	19,5
His	1,5	2,4	10,8
Lys	4,6	7,5	37,4
Arg	6,7	9,2	81,8

Porovnáním obsahu aminokyselin s klíčovou strukturní rolí (glycin, prolin, lysin – viz kapitoly 2.1.1, str. 13 a 2.3.2, str. 29) k obsahu celkových dusíkatých látek v jednotlivých vzorcích kolagenů lze konstatovat, že hovězí kolagen obsahuje nejvíce glycinu (19,9 %) a kuřecí kolagen má vyšší obsah glycinu (asi 13,3 %) než krůtí (10,7 %). Stejný trend vykazuje i obsah prolinu: hovězí 15 %, kuřecí 8,2 % a krůtí 7,2 %. Zajímavá situace nastává při srovnání obsahu lysinu – hovězí 3,8 %, kuřecí 4,5 % a krůtí 5,5 %. Lysin je v molekule kolagenu důležitý k tvorbě intra- a inter-molekulárních vazeb a jeho vyšší obsah zajišťuje vyšší rezistenci jak k termální, tak i k enzymatické degradaci [13].

Výsledky aminokyselinové analýzy naznačují, že hovězí kolagen by měl mít, díky vyššímu obsahu prolinu, rigidnější strukturu (neohebná, pevná vlákna), než preparáty kolagenu izolované z kuřecích a krůtích kůží, a ty by měly být, díky vyššímu obsahu lysinu, termicky i enzymaticky odolnější než surový hovězí kolagen. Obecně naměřený obsah dusíkatých látek v hovězím kolagenu je asi 7x vyšší než v krůtím a více než 9x vyšší než v kuřecím. Poměry obsahu aminokyselin jsou prakticky stejné ve všech vzorcích, převažujícími aminokyselinami je glycin a prolin, dále je poměrně hojně zastoupena kyselina glutamová, alanin, arginin a kyselina asparagová (seřazené dle klesajícího obsahu).

4.10 Vyhodnocení výsledků z ekonomického hlediska

V předložené práci byly zavedeny postupy izolace kolagenu z několika různých typů živočišných tkání a optimalizovány postupy izolace kolagenu z kuřecích a krůtích kůží. Tento materiál je z hlediska geografického i hospodářského postavení ČR výhodný a současně eliminuje obavy spojené s potenciálním přenosem infekce BSE z kolagenu hovězího původu.

Hovězí kolagen je dostupný komerčně a je nabízen za cenu cca 180 tis. Kč za 1 kg 8% suspenze kolagenu ve vodě. Ze srovnání charakteristik výsledného kuřecího i krůtího preparátu je patrné, že oba obsahují asi 80 % vody, přičemž surový kuřecí kolagen (vlhká hmotnost) představuje cca 12% suspenzi. Z 30 g kuřecí kůže lze tedy získat asi 3,6 g 12% kolagenu. Na 1 kg preparátu obsahujícího podobné množství kolagenu jako komerční hovězí preparát by bylo třeba cca 9 – 10 kg kuřecích kůží (maloobchodní cena za kg nepřesahuje 50 Kč). I když se zahrnou náklady na izolaci včetně nákladů na chemikálie, energie, pracovníky, vybavení laboratoří, skladování a distribuci, mohla by výroba kolagenu z kuřecích kůží představovat zajímavý artikl.

Předem je však třeba otestovat řadu dalších vlastností kuřecího kolagenu včetně mechanických charakteristik a biokompatibility, i když molekulární vlastnosti tohoto preparátu jsou velmi slibné.

5 ZÁVĚRY

- Předložená práce byla zaměřená na optimalizaci izolace kolagenu z různých druhů živočišných tkání, na studium a charakterizaci těchto preparátů a rovněž vybraných modifikovaných kolagenových biomateriálů ve srovnání s komerčním surovým hovězím kolagenem. K popisu molekulárních vlastností kolagenových preparátů byly použity metody spektrofotometrické, elektromigrační – gelová elektroforéza, mikrofluidní elektroforéza, chromatografické – gelová permeační chromatografie a vysokoúčinná ultrazvuková spektroskopie.
- Charakterizace a zpracování vzorků kolagenu je mimořádně komplikované a je ztíženo omezenou rozpustností proteinu a změnami konformace v roztoku. Nejvyšší obsah proteinů z modifikovaných kolagenů mají dezintegrované vzorky. Nejnižší obsah je u komerčního surového hovězího kolagenu, přičemž jeho lyofilizací se obsah proteinů přibližně zdvojnásobí.
- Izolace kolagenu byla provedena z pěti druhů živočišných tkání (kuřecí, krůtí, rybí, vepřové kůže a kuřecí hrudní chrupavky), procentuálně nejvyššího výtěžku bylo dosaženo z rybích kůží, k vyšším výtěžkům vedly i opakované izolace z kůží kuřecích, kde ovšem vyšší výtěžek byl získán vždy při nižší navážce, stejně jako u kůží krůtích. Nejnižšího výtěžku bylo dosaženo z kuřecích hrudních chrupavek. Optimalizace izolačního postupu u individuálních typů kolagenu je podmíněna vhodným poměrem množství a koncentrace extrakčních činidel.
- Metodou TNBSA bylo zjištěno, že z izolovaných preparátů obsahuje nejvyšší množství volných aminoskupin kolagen rybí. Tento údaj je významný zejména z hlediska případného využití kolagenu k přípravě síťovaných preparátů pro biomedicínké aplikace.
- Sušina vybraných kolagenových vzorků byla stanovena lyofilizací, která do jisté míry potvrdila kvalitu drůbežích preparátů, které v surovém stavu obsahují přibližně dvojnásobnou koncentraci kolagenu než dodávaný komerční hovězí preparát.
- Elektroforetická separace kolagenových preparátů na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (PAGE-SDS) byla optimalizována z hlediska hustoty gelu a podmínek dělení. Jako nejvhodnější hustota zesíťování gelu k separaci kolagenů byla vybrána 7,5 %, průměrný čas separace byl čtyři a půl hodiny při 90 V a 120 mA.
- Dle výsledků gelové elektroforézy lze konstatovat, že izolace byly úspěšné a podařilo se vyizolovat kuřecí, krůtí, vepřový i rybí kolagen. Všechny preparáty izolované z kůží patří do skupiny kolagenů typu I, pouze preparát izolovaný z kuřecí prsní přepážky se významně odlišuje od ostatních typů izolátů, nemá typické složení kolagenu I a obsahuje řadu interferujících složek a nečistot.

- U všech analyzovaných modifikovaných vzorků, stejně jako u kolagenových preparátů z jednotlivých izolací, jsou dobře patrné zóny kolem cca 300 kDa odpovídající celé molekule kolagenu a současně podjednotky o velikosti cca 120 – 140 kDa odpovídající příslušným α - a β -podjednotkám kolagenu.
- Aminokyselinové složení preparátů izolovaných z kuřecích a krůtích kůží naznačuje, že díky vyššímu procentuálnímu obsahu lysinu by měly být tyto kolageny termicky i enzymaticky odolnější než surový hovězí kolagen.
- Testy teplotní stability kolagenových vzorků prokázaly kompletní degradaci rybího kolagenu (pravděpodobně želatinaci) od cca 70 °C. Hovězí kolagen je stabilní do 50 °C, pak dochází k přechodné změně struktury a poté dochází k denaturaci až při teplotách 80 – 90 °C. Kuřecí kolagen je stabilní až do 90 °C. Termická stabilita byla testována i metodou ultrazvukové spektroskopie ve spolupráci s ÚFSCH FCH VUT v Brně. Výsledky elektroforetické i ultrazvukové spektroskopické analýzy umožňují podobnou interpretaci tepelné stability kolagenů.
- Z kolorimetrického stanovení peptidových vazeb vyplývá, že na stabilitu různých druhů kolagenu ve fyziologickém pufru má vliv typ kolagenu a teplota inkubace. Jako nejstabilnější se jeví kolagen rybí při 37 °C, při 25 °C ztrácí již za 2 hodiny asi 50 % původní aktivity, avšak dále se úbytek peptidových vazeb nemění. Kuřecí kolagen je rovněž stabilnější při 37 °C, avšak úbytek peptidových vazeb za 2 hod je při 37 °C kolem 20 % a za 48 hod cca 70 % původní hodnoty. Stabilita vepřového kolagenu je rovněž vyšší při 37 °C. Krůtí kolagen je nejméně stabilní ze všech izolovaných preparátů, do 24 hod dochází k jeho úplné degradaci.
- Z PAGE-SDS analýzy biologické stability kolagenních izolátů i komerčního hovězího kolagenu (48 hodinová inkubace) je zřejmé, že všechny preparáty vykazují podobný způsob chování v různých fyziologických prostředích, přičemž zde rozdílná teplota inkubace nemá nijak významný vliv. Ve fyziologickém pufru zůstaly všechny vzorky kolagenu relativně stabilní. Po inkubaci v lidském séru to nelze jednoznačně potvrdit, jelikož sérum tvoří na gelu výrazné zóny sérových proteinů a frakce odpovídající kolagenu tudíž na gelech viditelné nejsou. Existuje i možnost, že kolagen v tomto prostředí degradoval, ta je však málo pravděpodobná i proto, že všechny vzorky kolagenů zůstaly po inkubaci nerozpuštěny. Přítomnost kolagenázy v prostředí vedla k degradaci všech vzorků kolagenů, přičemž enzym je v daném prostředí a při obou testovaných teplotách poměrně stabilní.
- Kolagenové vzorky byly analyzovány i s využitím mikrofluidního elektroforetického systému Experion, kde je analýza automatizována a do podmínek daných výrobcem nelze zasáhnout. U všech analyzovaných preparátů kolagenu byly opakovaně detekovány podobné majoritní proteinové frakce odpovídající molekulovou hmotností kolagenovým podjednotkám – cca 200 kDa a cca 130 – 138 kDa.
- Při porovnání výsledků vertikální gelové elektroforézy PAGE-SDS a mikrofluidního elektroforetického systému na čípech vykazuje pro dané vzorky a podmínky více

kladů metoda PAGE-SDS, především z hlediska možnosti změny hustoty zesíťování gelu a nastavení podmínek. Metoda umožňuje i při poměrně značných molekulových rozměrech reprodukovatelné analýzy kolagenu, na gelech jsou jasně viditelné fragmenty odpovídající molekulové hmotnosti.

- V rámci studované problematiky byl zaveden a využit systém nízkotlaké kapalinové chromatografie (BioLogic LP, BioRad) k aplikaci gelové permeační chromatografie při purifikaci izolovaného kolagenu. Výsledky separace hovězího kolagenu potvrzují přítomnost jednoho velkého píku odpovídajícího molekulové hmotnosti cca 200 kDa a menšího píku, který by mohl odpovídat podjednotce o velikosti cca 130 kDa. Analýza kuřecího kolagenu z kůže potvrzuje přítomnost dvou podjednotek o velikosti cca 120 – 150 kDa. Chromatogramy obsahují i směsné píky odpovídající pepsinu. Metoda by mohla být použitelná k purifikaci i k odsolení kolagenu.
- Při diskuzi ekonomického hlediska je zřejmé, že náklady na izolaci kolagenu z testovaných biologických tkání jsou poměrně nízké, jelikož jde o živočišné kůže, které jsou v podstatě odpadem v potravinářském průmyslu. Z hlediska geografických i hospodářských podmínek ČR a s přihlédnutím k eliminaci potenciálního přenosu BSE z matrice hovězího původu by mohl být velmi perspektivní materiál drůbeží (kuřecí, popř. krůtí kůže).

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
AMK	aminokyseliny
APS	persíran amonný
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSE	bovinní spongioformní encefalopatie („nemoc šílených krav“)
ECM	extracelulární matrix
M	molarita
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PAGE-SDS	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SDS	dodecylsíran sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
T _d	teplota denaturační
TNBSA	kyselina trinitro-benzensulfonová
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T _s	teplota smrštění
UV	ultrafialová oblast záření

7 LITERATURA

- [1] PETERKOVÁ, P., LAPČÍK, L. Kolagen - vlastnosti, modifikace a aplikace. In *Chemické Listy*. 94. vyd., 371-379 (2000).
- [2] MURRAY, R.K., et al. Harperova Biochemie. Jiří Kraml. 23. vyd., 4. české, Nakladatelství H+H, 872 s. ISBN 80-7319-013-3 (2002).
- [3] *An Introduction to Biomaterials*. Edited by Scott A. Guelcher, Jeffrey O. Hollinger. Taylor & Francis Group, 553 s. Biomedical Engineering Series Edited by Michael R. Neuman. ISBN 0-8493-2282-0 (2006).
- [4] BLACK, J. *Biological Performance of Materials : Fundamentals of Biocompatibility*. 4th edition. Taylor & Francis Group, 497 s. ISBN 0-8493-3959-6 (2006).
- [5] WILLIAMS, D.F. *Definitions in Biomaterials, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*. 1987, Elsevier, Chester (1986).
- [6] RATNER, B., et al. Introduction: biomaterials science: a multidisciplinary endeavor, In: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner B., et al., Elsevier, Boston (2004).
- [7] JOHNSON, H.J., et al. Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. II. Objective methods of toxicity assessment, *J. Biomed. Mater. Res.*, 19, 489 – 508 (1985).
- [8] NORTHUP, S.J. Mammalian cell culture models, In: *Handbook of Biomaterials Evaluation: Scientific, Technical and Clinical Testing of Implant Materials*, von Recum, A. F., Ed., Macmillan, New York, pp. 209 – 225 (1986).
- [9] U.S. Pharmacopeia, *Biological reactivity tests in-vitro*, *U. S. Pharmacopeia* 23, Vol. 27. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2173 – 2175 (2004).
- [10] LU, Q., et al. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 25, 5227 – 5237 (2004).
- [11] MEINEL, L., et al. The inflammatory responses to silk films *in vitro* and *in vivo*, *Biomaterials*, 26, 147 – 155 (2005).
- [12] MA, L., et al. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges, *Biomaterials*, 25, 2997 – 3004 (2004).
- [13] ANGELE, P., et al. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices, *Biomaterials*, 25, 2831 – 2841 (2004).
- [14] YANNAS, I.V. Natural Materials, In: *Biomaterials Science*, Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F., and Lemons, J., Eds., Academic Press, New York, pp. 84 – 93 (1996).
- [15] RIGBY, B.J., et al. The mechanical properties of rat tail tendon, *J. Gen. Physiol.*, 43, 265 – 283 (1958).
- [16] MIRNAJAFI, A., et al. The effects of collagen fiber orientation on the flexural properties of pericardial heterograft biomaterials, *Biomaterials*, 26, 795 – 804 (2005).
- [17] LYNN, A.K., et al. Antigenicity and immunogenicity of collagen, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 71B, 343 – 354 (2004).
- [18] CUKIER, J., et al. Association between bovine collagen dermal implants and a dermatomyositis of a polymyositis-like syndrome, *Ann. Intern. Med.*, 188, 920 – 928 (1993).
- [19] SOO, C., et al. The immunogenicity of collagen implants, *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 19, 431 – 434 (1993).

-
- [20] CRETEL, E., et al. Still's-like disease, breast prosthesis, and collagen implants, *Rheumatol. Int.*, 20, 129 – 131 (2001).
- [21] WINKLER, S., KAPLAN, D.L. Molecular biology of spider silk, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 74, 85 – 93 (2000).
- [22] ALTMAN, G.H., et al. Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24, 401 – 416 (2003).
- [23] BOURKE, S.L., KOHN, J. Polymers derived from the amino acid *L*-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethylene glycol), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 447 – 466 (2003).
- [24] STRYER, L. *Biochemistry*, W.H. Freeman, San Francisco (1981).
- [25] LOEB, W.F., MACKEY, W.F. A "Cuvette Method" for the determination of plasma fibrinogen, *Bull. Am. Soc. Vet. Clin. Pathol.*, 1, 5 – 8 (1972).
- [26] FUNG, Y.C. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*, Springer, Berlin (1993).
- [27] DUAN, R., et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112, 702 – 706 (2009).
- [28] WANG, L., et al. Extraction of pepsin-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using an artificial neural network. *Food Chemistry*, 111, 683 – 686 (2008).
- [29] WOOD, A., et al. Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 151, 246 – 249 (2008).
- [30] SONG, E., et al. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27, 2951 – 2961 (2006).
- [31] KOLADZIEJAKA, I.E., SIŁORSKI, Z., NIECIKOWSKA, C. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chemistry*, 66, 153 – 157 (1999).
- [32] NAGAI, T., ARAKI, Y., SUZUKI, N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78, 173 – 177 (2002).
- [33] NAGAI, T., SUZUKI, N. Isolation of collagen from fish waste material – Skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68, 277 – 281 (2000).
- [34] OGAWA, M., et al. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, 88, 495-501 (2004).
- [35] SADOWSKA, M., KOLADZIEJAKA, I., NIECIKOWSKA, C. Isolation of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81, 257 – 262 (2003).
- [36] KIMURA, K., MIYAUCHI, Y., UCHIDA, N. Scale and bone type I collagen of carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B(2), 473 – 476 (1991).
- [37] ZHANG, Y., et al. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103, 906 – 912 (2007).
- [38] KOMSA-PENKOVA, R., et al. Discrete reduction of type I collagen thermal stability upon oxidation. *Biophysical Chemistry*, 83, 185 – 195 (1999).
- [39] PEČ, P., a kolektiv. *Laboratorní cvičení z biochemie*, UP, fakulta Přírodovědecká, Olomouc (2000).

-
- [40] *Laboratorní cvičení z biochemie : Vysokoškolský učební text pro posluchače VŠCHT, UK v Praze, UP v Olomouci a MU v Brně.* Milan Kodíček, Olga Valentová. VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie (2000).
- [41] MÁROVÁ, I. *Praktikum z instrumentální analýzy*, Fakulta chemická, Brno (2008).
- [42] MÁROVÁ, I., VRÁNOVÁ, D. *Praktikum z biochemie*, Fakulta chemická, Brno (2002).
- [43] FIORINI, G., CHIU, D. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application, *BioTechniques.*, 38, 429 – 446 (2005).
- [44] LI, H., et al. Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry.*, 84, 65 – 69 (2004).
- [45] OGAWA, M., et al. Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen, *J. Agric. Food Chemistry.*, 51, 8088 – 8092 (2003).
- [46] PIEZ, K.A. In K.A. Piez & A.H. Reddi (Eds.), *Extracellular matrix biochemistry.*, New York: Elsevier, 1 – 39 (1984).
- [47] MIKULÍKOVÁ, Z. *Degradace biomateriálů v modelovém fyziologickém prostředí.*, VUT v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc. (2008).
- [48] HABEEB, A.F.S.A. Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfonic acid, *Anal. Biochemistry.*, 14, 328 (1966).
- [49] Instructions for TNBSA (2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid), Pierce Chemical Company (1999).
- [50] VOET, D., VOETOVÁ, J. *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, ISBN 80-85605-44-9 (1990).
- [51] Bio-Rad. *Experion Pro260 Analysis Kit, Instruction Manual.*, Bio-Rad Laboratories, Inc.
- [52] BUBNIS, W.A., OFNER, C.M. The determination of ϵ -Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid, *Analytical Biochemistry.*, 207, 129 – 133 (1992).